

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ante Ševo

**Utvrdjivanje povezanosti primarnih
oštećenja DNA spermija s
reproduktivnom sposobnošću
muškaraca**

Diplomski rad

Zagreb, 2014. godina

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ante Ševo

**Utvrdjivanje povezanosti primarnih
oštećenja DNA spermija s
reproduktivnom sposobnošću
muškaraca**

Diplomski rad

Zagreb, 2014. godina

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Benković, kao i u Laboratoriju za medicinsku oplodnju u Poliklinici Škvorc, pod vodstvom dr. sc. Patrika Stanića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Iznimno se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Vesni Benković na srdačnosti, podršci, razumijevanju i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada. Također se zahvaljujem dr. sc. Patriku Staniću, mag. biol. mol. Sonji Šogorić, dr. med. Nenadu Škvorcu i dr. med. Valentini Škvorc na stimulirajućoj atmosferi, usmjeravanju, savjetima i omogućavanju svega ovoga te svim ostalim zaposlenicima i sudionicima Zavoda za animalnu fiziologiju (Biološki odsjek PMF-a) i Poliklinike Škvorc.

Zahvalio bih se mojoj majci Lovorki Šavar što me je rodila, svakodnevno obasipavala bezuvjetnom ljubavlju, pružila mi i više nego što mi je trebalo, uvijek bila potpora i apsolutni autoritet i uzor. Također bih se zahvalio mojoj budućoj ženi Sonji Šogorić, srodnoj duši i nadopuni te uzoru i potpori. Isto tako, zahvalio bih se bratu Božidaru Ševi na strpljenju, razumijevanju i potpori, kao i ostalim članovima obitelji, prijateljima i poznancima koji su sudjelovali na prethodno navedene načine.

Na kraju, zahvalio bih se samome sebi što sam donio niz odluka koje su me dovele do ovog životnog trenutka, što sam odlučio studirati znanost o životu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UTVRĐIVANJE POVEZANOSTI PRIMARNIH OŠTEĆENJA DNA SPERMIJA S REPRODUKTIVNOM SPOSOBNOSTI MUŠKARACA

Ante Ševo

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Humani spermij je muška reproduktivna haploidna stanica (23 kromosoma), koja se spaja sa humanom jajnom stanicom - ženskom reproduktivnom haploidnom stanicom (23 kromosoma) te zajedno stvaraju diploidnu stanicu, koja se razvija u novi organizam. Kvaliteta spermija, kao i nastanak spermija, ovise o genetskoj pozadini i promjenama, fizičkim traumama te mnogim egzogenim i endogenim čimbenicima u testisima i okolnom tkivu te sporednim organima koji čine dio reproduktivnog trakta. Analizom tradicionalnih sjemenih parametara prema WHO smjernicama te oštećenja DNA spermija komet testom utvrđena je međusobna povezanost navedenih parametara, kao i povezanost životnih navika i navedenih parametara. Oštećenje DNA spermija nije statistički značajno povezano s tradicionalnim sjemenim parametrima (koncentracija, pokretljivost i građa spermija te dob ispitanika). Konzumiranje cigareta i pripravaka biljke *Cannabis* ne utječe značajno na kvalitetu spermija, dok konzumiranje alkohola smanjuje pokretljivost i koncentraciju spermija.

(46 stranica, 8 slika, 5 tablica, 74 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: humana stanica, testis, komet test, životne navike

Voditelj: Dr. sc. Vesna Benković, izv. prof.

Neposredni voditelj: Dr. sc. Anica Horvat Knežević

Ocjenitelji: Dr. sc. Vesna Benković, izv. prof.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, prof.

Rad prihvaćen: 12. rujna 2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

DETERMINING THE RELATIONSHIP OF PRIMARY DNA DAMAGES OF SPERM AND FERTILE ABILITY OF MEN

Ante Ševo

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb

Human sperm is male reproductive haploid cell (23 chromosomes) which merges with the human ovum - the female reproductive haploid cell (23 chromosomes), create a diploid cell, which develops into a new organism. The overall quality of the sperm, as well as the formation of the sperm, depends on the genetic background and changes, physical trauma, and many exogenous and endogenous factors in the testicles and surrounding tissue and secondary organs that form the reproductive tract. The analysis of traditional semen parameters according to WHO guidelines and DNA damage sperm by comet assay showed correlations of these parameters, as well as relationship between lifestyle and these parameters. Sperm DNA damage isn't significantly associated with traditional semen parameters (concentration, motility and sperm morphology and age of the examinee). The consumption of cigarettes and *Cannabis* does not significantly affect the quality of sperm, whereas alcohol consumption decreases the motility and sperm concentration.

(46 pages, 8 figures, 5 tables, 74 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central biological library

Key words: human cell, testicle, comet assay, lifestyle

Supervisor: Vesna Benković, PhD, Assoc. Prof.

Assistant supervisor: Anica Horvat Knežević, PhD

Reviewers: Vesna Benković, PhD, Assoc. Prof.

Željka Vidaković-Cifrek, PhD, Assoc. Prof.

Gordana Lacković-Venturin, PhD, Prof.

Thesis accepted: 12 September 2014

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Plodnost muškaraca.....	1
1.2. Humani spermij.....	2
1.2.1. Spermatogeneza i spermiogeneza.....	2
1.3. Oštećenja humanog spermija.....	7
1.3.1. Oštećenja DNA humanog spermija.....	8
1.3.1.1. Promjene strukture kromatina.....	9
1.3.1.2. Apoptoza.....	11
1.3.1.3. Oksidativni stres.....	12
1.4. Cilj istraživanja.....	13
2. METODE I MATERIJALI.....	14
2.1. Ispitanici.....	14
2.2. Analiza ejakulata - spermioqram.....	15
2.2.1. Određivanje koncentracije spermija.....	15
2.2.2. Određivanje pokretljivosti spermija.....	16
2.2.3. Određivanje građe spermija.....	17
2.2.4. Zamrzavanje spermija.....	19
2.2.5. Odmrzavanje spermija.....	19
2.2.6. Komet test.....	20
2.3. Statistička obrada.....	21
3. REZULTATI.....	22
3.1. Korelacija DFI spermija i sjemenih parametara.....	22
3.2. Kvalitativni prag DFI spermija.....	25
3.3. Usporedba normozoospermije sa dijagnozom astheno/oligo/teratozoospermije.....	26
3.4. Životne navike.....	27
4. RASPRAVA.....	29
5. ZAKLJUČCI.....	32
6. LITERATURA.....	33
7. PRILOZI.....	40
7.1. Obavijest za ispitanika.....	40
7.2. Suglasnost za ispitanika.....	45
8. ŽIVOTOPIS.....	47

1. UVOD

1.1. Plodnost muškaraca

Neplodnost ili smanjena plodnost svakodnevno zahvaćaju sve veći broj muškaraca, stoga potreba za pronalaskom uzroka, jasnije dijagnostike i bolje prevencije postaje prioritet. Otprilike 10-15% parova reproduktivne dobi ne mogu začeti kroz dvanaest uzastopnih mjeseci nezaštićenog seksualnog odnosa te se zbog toga smatraju neplodnima (Saleh i sur. 2002). Muški čimbenik je odgovoran za gotovo 50% takvih slučajeva, samostalno u 20% slučajeva, a zajedno sa ženskim čimbenikom u 30-40% slučajeva. Isto tako, 15% muškaraca s normalnim parametrima analize ejakulata imaju smanjenu plodnost (Evgeni i sur. 2014).

Tradicionalne metode analize humanog ejakulata (koncentracija, pokretljivost i građa) postaju nedovoljne kao dijagnostički alat određivanja muške plodnosti te se očuvanosti DNA spermija pridaje velika važnost kao komplementarne metode i biološkog markera reproduktivnog zdravlja i plodnosti. Osim smanjene pokretljivosti i koncentracije te patološke građe spermija, oštećenje DNA spermija zbog endogenih i egzogenih faktora pridonosi neuspješnosti oplodnje, pobačaju i raznim malformacijama ploda. Za razliku od ostalih stanica, spermiji su osjetljiviji na oštećenja DNA jer nemaju sposobnost popravka DNA (Chi i sur. 2011).

Mnoge studije su pokazale da postoji odnos između oštećenja DNA humanog spermija i raznih parametara humanog ejakulata (pokretljivost, građa i koncentracija spermija) (Chi i sur. 2011). Upravo zbog svega prethodno navedenog važno je razjasniti odnos između tradicionalne analize ejakulata i fragmentacije DNA spermija, upozoriti muškarce na moguće probleme uzrokovane načinom života te ih dodatno obrazovati o njihovoj plodnosti. Isto tako, navedene analize su važne i zbog postupaka medicinske oplodnje, kako bismo odabrali što bolju kvalitetu spermija.

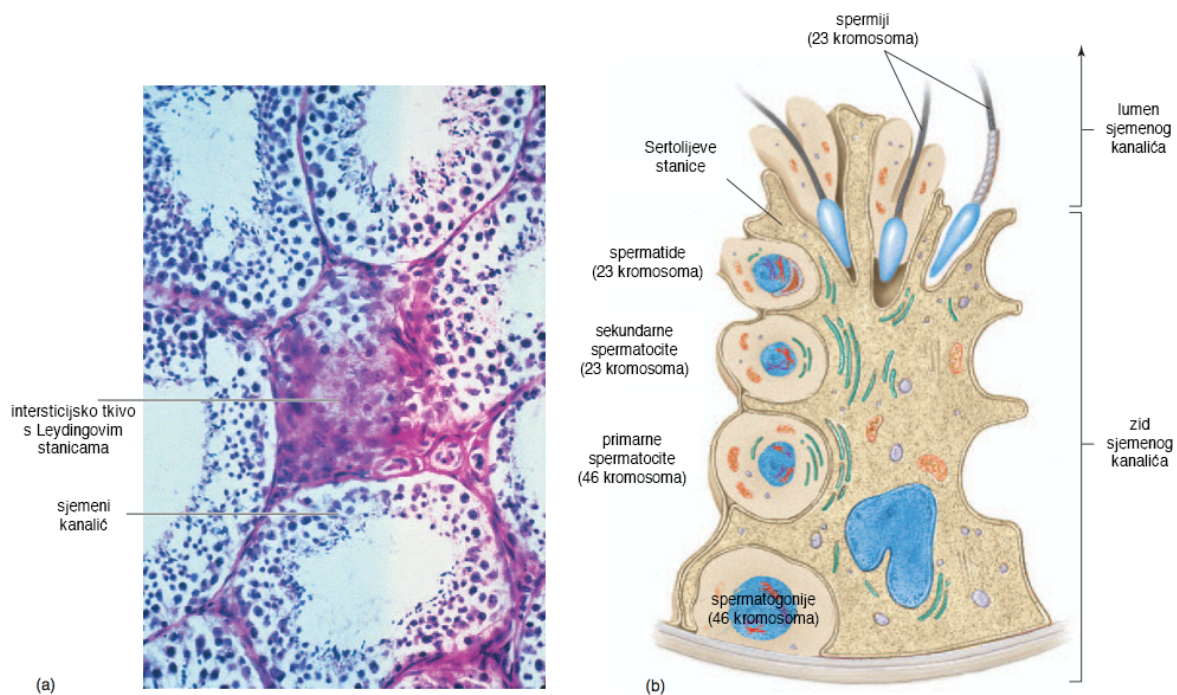
1.2. Humani spermij

1.2.1. Spermatogeneza i spermiogeneza

Humani spermij je muška reproduktivna haploidna stanica (23 kromosoma), koja se spaja sa humanom jajnom stanicom - ženskom reproduktivnom haploidnom stanicom (23 kromosoma) te zajedno stvaraju diploidnu stanicu, koja se razvija u novi organizam (Carlson 2013).

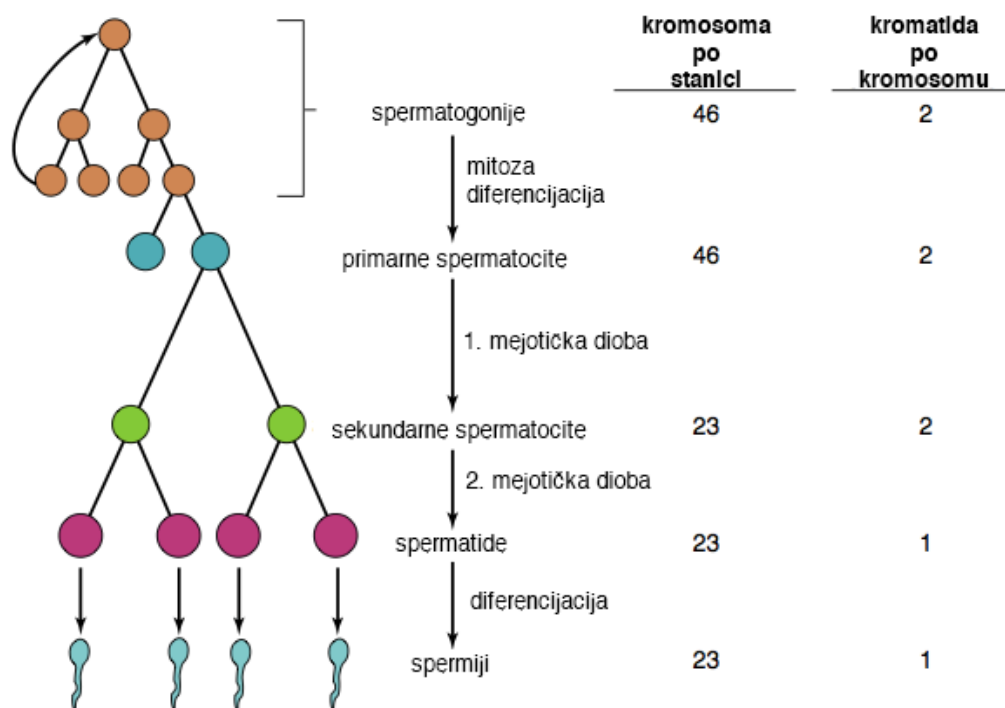
Humani spermij nastaje spermatogenezom koja započinje u sjemenim kanalićima testisa početkom puberteta. Sam proces započinje mitotičkom proliferacijom spermatogonija (Slika 1) (Fox 2004). Na bazi sjemenog epitela nalazi se nekoliko populacija spermatogonija. Spermatogonije tipa A predstavljaju populaciju matičnih stanica koja mitozom održava određeni broj spermatognija kroz život. Tip A diferencira u tip B koji završava mitotički ciklus i ulazi u mejozu. Zanimljivo je spomenuti da su mnoge spermatogonije i njihovi potomci povezani međustaničnim citoplazmatskim mostovima kako bi ostvarili kvalitetniju komunikaciju (Carlson 2013).

Sve spermatogonije su izdvojene na bazi sjemenog epitela procesom koji obavljaju Sertolijeve stanice (složene stanice pravilno raspoređene na periferiji sjemenog epitela i zauzimaju oko 30% volumena) (Slika 1). Upravo ti procesi i bliskost Sertolijevih stanica formiraju imunološku barijeru (krv-testis barijera) između nastajućih stanica spermija i ostatka tijela, uključujući spermatogonije (Carlson 2013).



Slika 1. (a) Poprečni presjek sjemenih kanalića koji pokazuje okolno intersticijsko tkivo. (b) Stupnjevi spermatogeneze unutar germinativnog epitela sjemenog kanalića (Fox 2004).

Kad započnu mejozu, nastajuće stanice spermija su imunološki različite od ostatka tijela. Potomci spermatogonija tipa B su primarne spermatocite, koje su započele prvu mejotičku diobu (traje 24 dana). Nalaze se unutar sloja spermatogonija, duboko ukorijenjene u citoplazmu Sertolijevih stanica. Nakon završetka prve mejotičke diobe, primarne spermatocite stvaraju dvije sekundarne spermatocite koje ulaze u drugu mejotičku diobu bez odgađanja (traje oko 8 sati). Svaka sekundarna spermatocita stvara dvije nezrele haploidne gamete - spermatide (Slika 2) (Vander 2001).

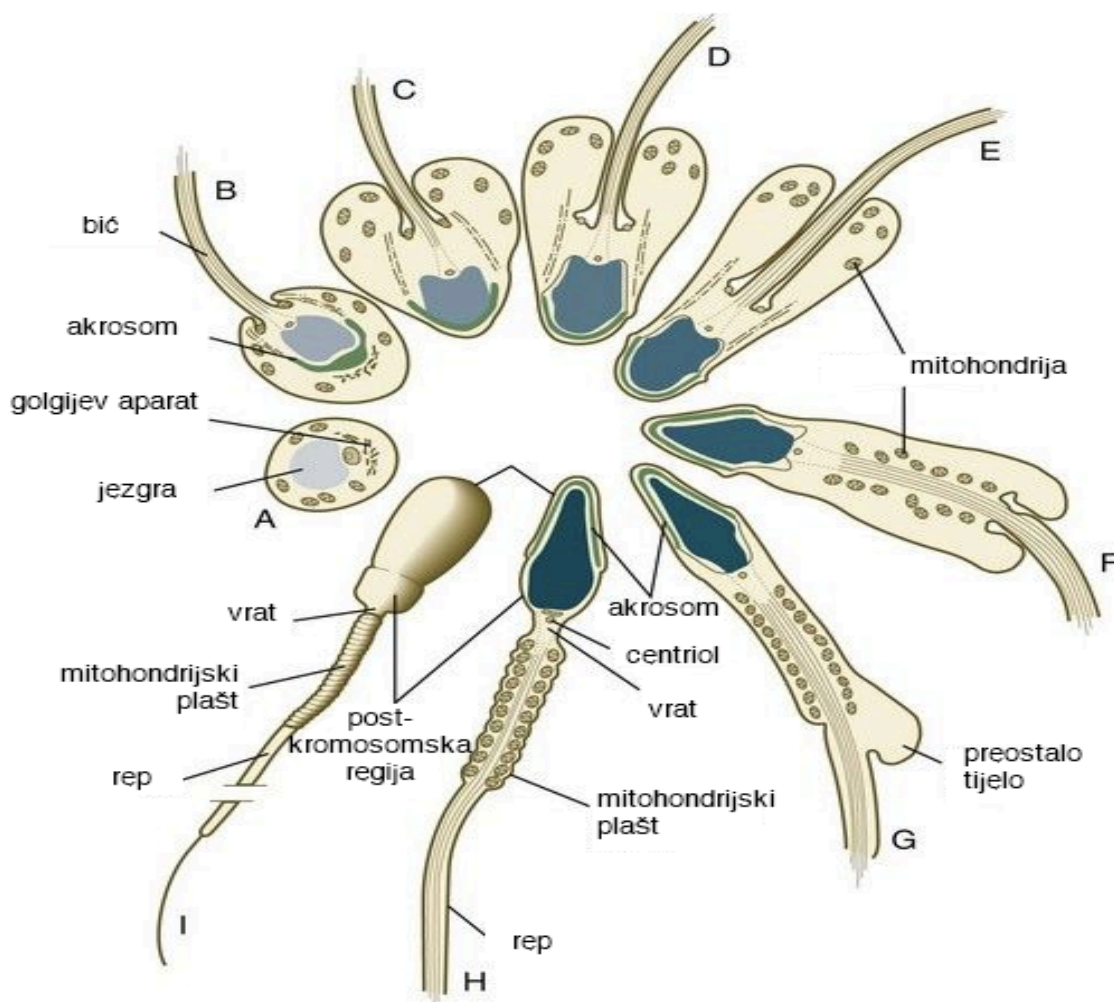


Slika 2. Spermatogeneza, počevši od spermatogonija i završivši sa zrelim spermijem (Vander 2001).

Spermatide se dalje ne dijele, no podliježu nizu promjena koje ih čine visoko specijaliziranim stanicama. Taj proces se naziva spermiogenezom ili spermatidnom metamorfozom (Slika 3) (Fox 2004). Neke od bitnijih promjena su smanjenje jezgre, značajna kondenzacija kromosomalnog materijala (povezana uz zamjenu histona protaminima), reorganizacija citoplazme (udaljavanje od jezgre), kondenzacija Golgijevog aparata na apikalnom dijelu jezgre (nastajanje akrosoma, strukture pune enzima koja ima ključnu ulogu u oplodnji), dok se na drugom kraju jezgre formira rep iz centriolarne regije; mitohondriji se slažu spiralno oko proksimalnog dijela repa, a kako se spermiogeneza odvija ostatak citoplazme se odmiče od jezgre i otpada kako se rep razvija (otpad fagocitiraju Sertolijeve stanice) (Carlson 2013).

U specifičnom trenutku razvoja spermatida, adhezija površinskih struktura se gubi te njihovi fragmenti zajedno sa citokinima i proteinazama razaraju krv-testis barijeru, čime omogućuju odlazak zrelih spermatida u lumen sjemenih kanalića. Testosteron stimulira sintezu novih proteina koji ponovno stvaraju krv-testis barijeru, a novi set adhezijskih struktura omogućava ponovno vezanje spermatida na apikalnu površinu Sertolijevih stanica. Spermiogeneza traje otprilike 64 dana od početka spermatogeneze. Stanica spermija je

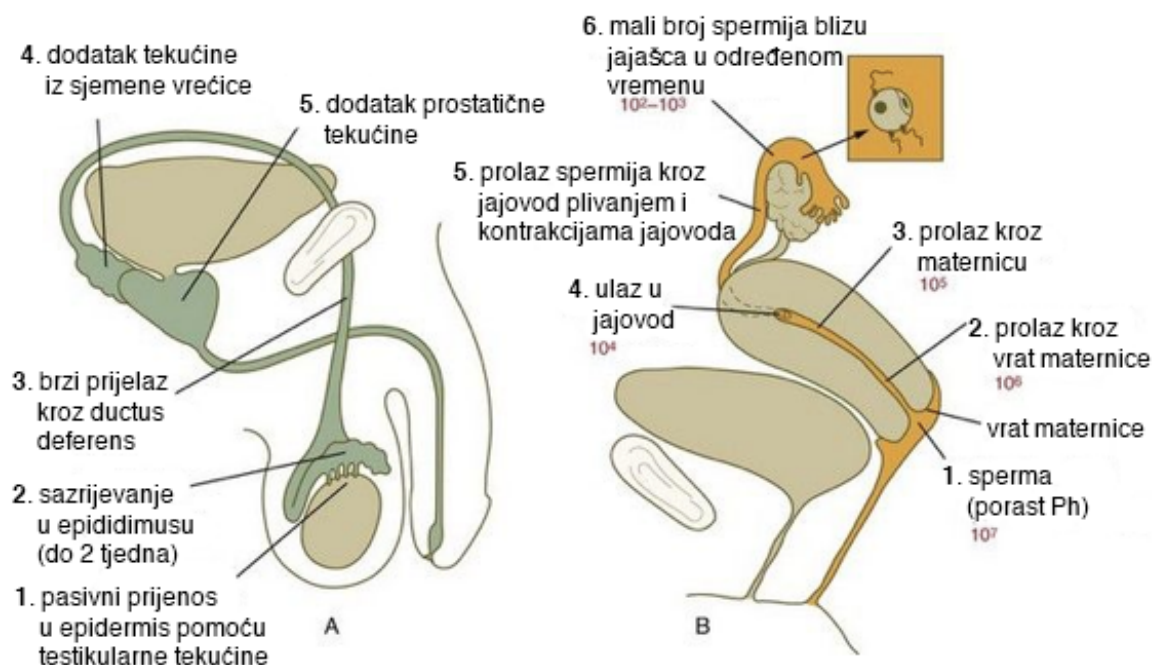
visoko specijalizirana, prilagođena za gibanje i dostavu nasljednog materijala; sastoji se od glave (2 do 3 μm širok i 4 do 5 μm dugačak) koja sadrži jezgru i akrosom; vratnog dijela koji sadrži centriole i mitohondrijsku zavojnicu; te repa (oko 50 μm) (Slika 3) (Carlson 2013).



Slika 3. Glavni stadiji spermiogeneze, počevši sa spermatidom (A) i završivši sa zrelim spermatozoonom (I) (Carlson 2013).

Transport spermija se odvija i u muškom (strukturalno i funkcionalno sazrijevanje) i u ženskom (dolazak do ovulacijskog jajašca) reproduktivnom traktu (Slika 4). Nakon spermiogeneze u sjemenim kanalićima spermiji su morfološki zreli, no nepokretni su i u nemogućnosti oploditi jajašce. Spermiji se pasivnim transportom pomoću testikularne tekućine gibaju od sjemenih kanalića do glave epididimisa, kroz rete testis i izlazne cjevčice. Usmjeravani su tlakom tekućine i kontrakcijama glatkih mišića te cilijarnim strujama u

izlaznim cjevčicama. U epididimisu, dužine 6 metara, spermiji prolaze biokemijsko sazrijevanje (dolazi do promjena u glikoproteinima plazma membrane glave spermija) oko 12 dana (Carlson 2013).



Slika 4. Transport spermija u (A) muškom i (B) ženskom reproduktivnom traktu. Broj spermija (B) nađenih u različitim dijelovima ženskog reproduktivnog trakta označeni crveno (Carlson 2013).

Veličina testisa utječe na ukupni broj spermija u ejakulatu, odnosno na spermatogensku aktivnost, koja utječe na građu spermija (Holstein i sur. 2003). Ako osoba nije ejakulirala neko vrijeme (otprilike 5 tjedana), spermiji se nakupljaju u epididimisu te odlaze u uretru i ispiru se urinom te odlaze iz tijela. Obzirom da epididimis nikad nije potpuno ispražnjen od spermija, neki ostaju od prijašnjih ejakulacija, zbog čega sam ejakulat varira starošću i kvalitetom spermija (Cooper i sur. 1993).

Tijekom ejakulacije, sperma nastaje od koncentrirane suspenzije spermija (u parnim epididimisima) pomiješane i razrijeđene sa izlučevinama iz sporednih spolnih organa. Većinu volumena sperme čine izlučevine iz prostate i sjemenih vezikula (90%), dok ostali dio čine izlučevine iz bulbouretralnih žlijezda i epididimisa (10%). Pokretljivost, građa i koncentracija spermija te sastav sjemenne tekućine iznimno su bitni za funkciju spermija (Carlson 2013).

1.3. Oštećenja humanog spermija

Podaci dobiveni uobičajenim metodama analize humanog ejakulata mogu dosta toga reći o kvaliteti spermatogenetskih procesa koji odlučuju hoće li nastati funkcionalan spermij sposoban za oplodnju. Koncentracija spermija, pokretljivost i građa povezani su sa plodnošću *in vivo* i *in vitro* te pokazuju kakav je bio razvoj unutarstaničnih struktura spermija tijekom spermatogeneze u testisima, sazrijevanja u epididimisu i sadržaju sjemene plazme (Evgeni i sur. 2014). Anatomske nepravilnosti spermija povezane su sa nekoliko problema plodnosti, poput nepravilne građe glave spermija koja je povezana sa gubitkom trudnoće, nepravilnog vrata ili repa koji mogu utjecati na pokretljivost (Carrel i sur. 2003).

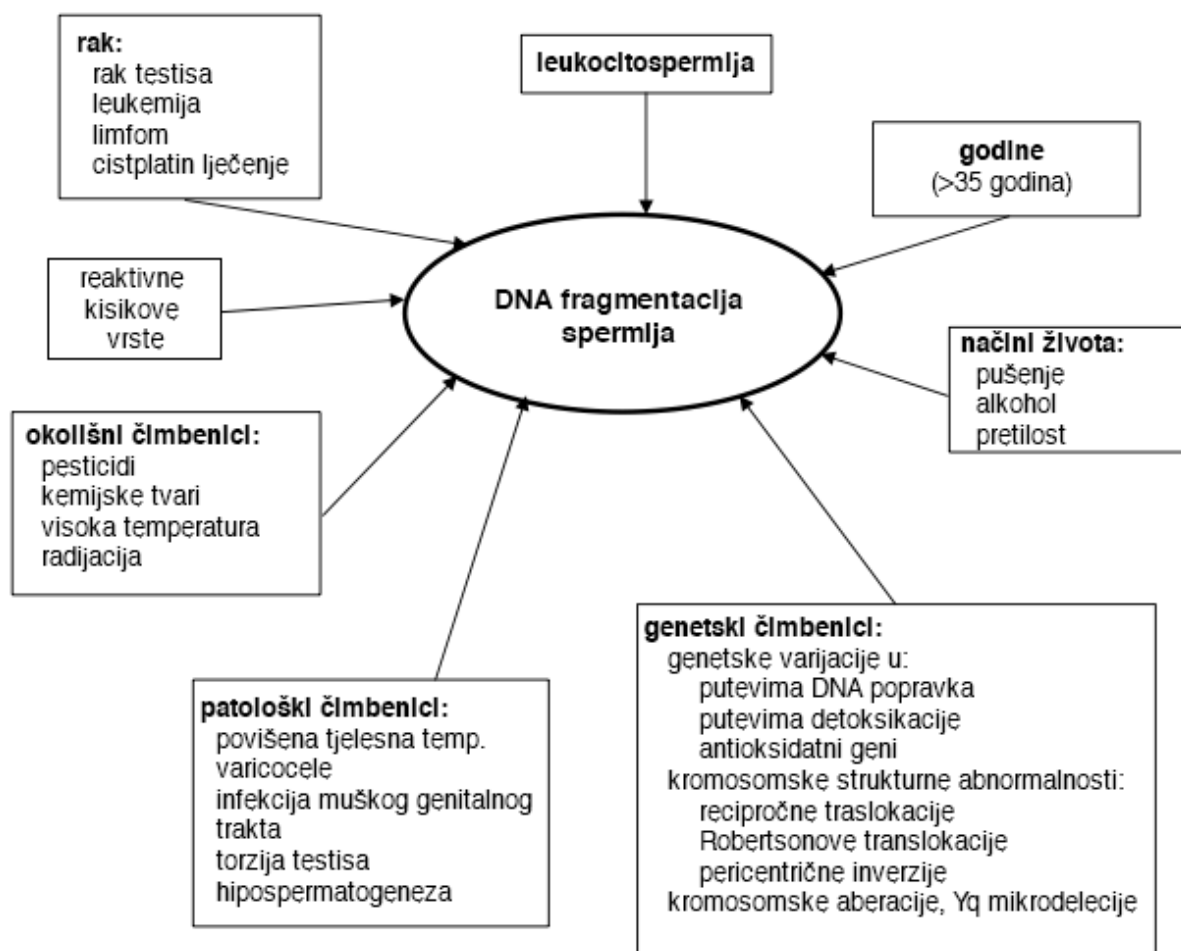
Otklon od referentnih vrijednosti jednog ili više prethodno navedenih parametara može poslužiti kao pokazatelj da je muškarac neplodan (Andrade-Rocha i sur. 2003). Sama kvaliteta spermija, kao i nastanak spermija, ovise o genetskoj pozadini i promjenama, fizičkim traumama te mnogim egzogenim i endogenim čimbenicima u testisima i okolnom tkivu te sporednim organima koji čine dio reproduktivnog trakta (WHO 2010). Usprkos svemu, prisutnost lošeg spermioograma ne mora nužno garantirati neplodnost, kao i što normalni spermioogram ne mora garantirati uspješnu oplodnju (Nallella i sur. 2006).

Na temelju kvalitete spermija, ejakulat dijelimo prema slijedećoj nomenklaturi: aspermija - nema sperme; asthenozoospermija - postotak progresivno pokretnih spermija ispod referentne granice; asthenoteratozoospermija - postotak progresivno pokretnih i normalno građenih spermija ispod donje referentne granice; asthenooligoteratozoospermija - ukupni broj ili koncentracija te postotak progresivno pokretnih i normalno građenih spermija ispod donje referentne granice; azoospermija - nema spermija; kriptozoospermija - nema spermija u svježim uzorcima, no prisutni su u centrifugiranim kuglicama; hematospermija - prisutnost eritrocita; leukospermija - prisutnost leukocita iznad dopuštene granice; nekrozoospermija - niski postotak živih i visoki postotak nepokretnih spermija; normozoospermija - ukupni broj ili koncentracija, postotak progresivno pokretnih te normalno građenih spermija jednak ili iznad donje referentne granice; oligoasthenozoospermija - ukupan broj ili koncentracija te postotak progresivno pokretnih spermija ispod donje referentne granice; oligoteratozoospermija - ukupan broj ili koncentracija te postotak normalno građenih spermija ispod donje referentne granice;

oligozoospermija - ukupan broj ili koncentracija spermija ispod donje referentne granice;
teratozoospermija - postotak normalno građenih spermija ispod donje referentne granice
(WHO 2010).

1.3.1. Oštećenja DNA humanog spermija

Oštećenje DNA možemo povezati sa sljedećim glavnim mehanizmima (Slika 5): odsustvo apoptoze tijekom mejoze I rezultira neispravnim ejakuliranim spermijima; neispravna kondenzacija kromatina tijekom spermiogeneze koja uključuje neispravnu protaminaciju i nedovoljno pakiranje kromatina (Leduc i sur. 2008); post-testikularni oksidativni stres nastao zbog neravnoteže između reaktivnih kisikovih radikala i antioksidansa (Lin i sur. 2008); fragmentacija potaknuta endogenim kaspazama i endonukleazama; uzajamni učinci različitih patoloških endogenih ili okolišnih čimbenika poput raka, lijekova (De Palma i sur. 2000), varicocela (French i sur. 2008), povišena tjelesna temperatura (Sergeyev i sur. 2007), leukocitospermija (Saleh i sur. 2002), izloženost toksičnim agensima. Osim navedenog, varijacije i polimorfizmi u genima koji igraju ključnu ulogu u procesima regulacije cjelovitosti genoma, mejotske rekombinacije, gametogeneze, dovode do povećane DNA fragmentacije (Evgeni i sur. 2014).



Slika 5. Glavni uzročni čimbenici fragmentacije DNA spermija (Evgeni i sur. 2014).

1.3.1.1. Promjene strukture kromatina

Kromatin spermija je visoko kondenzirana i organizirana struktura koja se sastoji od haploidne DNA i heterogenih proteina (Lin i sur. 2008). Ekstremno zbijene strukture nastale međudjelovanjem DNA spermija i proteina omogućuju visokostabilni i transkripcijski inertni kromatin. Prva biokemijska promjena je zamjena većine somatskih histona posebnim oblicima specifičnim za testise. Isto tako, većina histona, uključujući i one specifične za testise, sintetiziraju se prije i tijekom sastavljanja tranzicijskih proteina i protamina, a neki su nužni u procesu kondenzacije kromatina i reorganizacije genoma (Martianov i sur. 2005). Tijekom spermiogeneze većina histona se zamjenjuje specifičnim proteinima, uključujući i tranzicijske proteine (TNP), koji se s vremenom zamijene protaminima. Tranzicijski proteini se vežu za DNA te istovremeno destabiliziraju

nukleosome i održavaju normalnu obradu protamina, čime promiču kondenzaciju kromatina. Tijekom prolaska spermija u epididimis, unakrsno povezivanje cisteinskih krajeva protaminskih disulfidnih veza pojačava stabilizaciju nukleoprotaminskog kompleksa, koji se mora dekondenzirati kod zrelog i zdravog spermija tijekom oplodnje i reorganizirati se u nukleosomalnu strukturu. Dakle, organizacija DNA u jezgri spermija ne omogućava samo izvrsno pakiranje genetičke informacije da bi se sigurno prebacila u jajnu stanicu, već također dopušta preobrazbu u puno otpušteniju konfiguraciju kako bi genetička informacija bila pristupačnija zametku u razvoju. Oko 15% DNA spermija je povezano s histonima i ostalim proteinima u standardnu nukleosomalnu strukturu, dok je 85% u obliku visoko zbijenog nukleoprotaminskog kompleksa (Angelopoulou i sur. 2007).

Protamini su visokobazični proteini, otprilike dva puta manji od histona te u ljudi nalazimo dva tipa - P1 i P2 (Evgeni i sur. 2014). Protamini i tranzicijski proteini su produkti jedinstvene ekspresije gena samo u germinativnim stanicama muškaraca. Ljudi i još neki sisavci imaju dva tipa protamina - P1 i P2, a njihov omjer je otprilike 1:1. Odstupanja u navedenom omjeru, kao i odsustvo P2 mogu rezultirati neplodnošću (Balhorn i sur. 1999). Abnormalna ekspresija protamina je povezana sa smanjenom brojnošću spermija, smanjenom pokretljivošću, lošijom građom, smanjenom mogućnošću oplodnje i povećanom oštećenju DNA (Aoki i sur. 2005).

Tijekom kondenzacije jezgre spermija događa se mnogo promjena, uključujući topološka preslagivanja, tranzicije DNA-vezujućih proteina, promjene u transkripciji te gubitak nukleosomalne strukture. Endogena nukleaza stvara i spaja ureze na DNA lancima tijekom srednje faze spermiogeneze, dok u zrelim spermijima nije prisutna (Spano i sur. 2005). Isto tako, bilo kakve promjene u epigenetičkim mehanizmima, poput selektivnog zadržavanja i modifikacije histona, modifikacije transkripcijskih faktora i proteosoma, DNA metilacije, mogu doprinijeti smanjenju funkcije spermija (Evgeni i sur. 2014).

Tijekom pakiranja kromatina aktivnost endogene nukleaze (topoizomeraza II) je bitna za cijepanje, a zatim i za ligaciju ureza koji promiču protaminozu. Ti urezi smanjuju torzijski stres i potpomažu preuređivanje kromatina tijekom zamjene histona protaminima (McPherson i Longo 1993). Tranzicijski proteini u sisavaca su eksprimirani u većim količinama u srednjim koracima spermiogeneze, što se podudara s preuređenjem kromatina i uključeni su u popravak jednolančanih DNA lomova; mogu stimulirati popravak

jednolančanih lomova *in vitro*, kao i popravak UV induciranih DNA ozljeda *in vivo*; sudjeluju u popravku nakon genotoksičnog napada te zbog toga imaju bitnu ulogu u održavanju cjelovitosti muške haploidnosti (Caron i sur. 2001). Nakon vezanja tranzicijskih proteina na DNA, transkripcija prestaje. Upravo taj prestanak transkripcije slijedi nakon popravka DNA lomova i početka vezanja fosforiliranih protamina (male molekularne mase, jako bazični, pakiranju DNA u volumen 20 puta smotaniji nego u jezgri somatskih stanica); njihova fosforilacija omogućava ispravno vezanje na DNA, dok povećana kondenzacija kromatina spermija slijedi nakon defosforilacije (Wouters-Tyrou i sur. 1998).

1.3.1.2. Apoptoza

Apoptoza (programirana stanična smrt) je fiziološki mehanizam kontroliranog uklanjanja stanica, komplementarna, ali suprotna mitozu, nužna za razvoj određene populacije stanica i održavanje homeostaze organizma tijekom odraslog života (Kerr i sur. 1972). Smrt zametnih stanica je nužan proces tijekom normalnog razvoja kako bi na ispravan način nastale gamete te služi kako bi se kontrolirao prekomjeren broj zametnih stanica eliminirajući višak. Isto tako, može se pojaviti kao odgovor na kontrolne točke diobe stanica te sudjelovati u uklanjanju oštećenih ili opasnih stanica (Baum i sur. 2005). Smrt zametnih stanica koja se događa tijekom normalne spermatogeneze u sisavaca, smatra se odgovornom za gubitak otprilike 75% mogućeg broja spermija. Dakle, programirana stanična smrt igra bitnu ulogu u spermatogenezi. Spermiji unutar testisa sadrže manje DNA oštećenja, nego oni iz ejakuliranih spermija (Angelopoulou i sur. 2007). U ejakuliranim spermijima opaženi su i apoptoza i nekroza, no nije jasno zadržavaju li ejakulirani spermiji mogućnost aktivacije apoptotske kaskade ili su opaženi apoptotski markeri u spermiju ekspresija apoptotskog procesa koji je započeo prije same ejakulacije. Nadalje, tijekom *in vitro* obrade, spermiji ne mogu ući u apoptotski put te su odstranjeni nekrozom (Angelopoulou i sur. 2007).

1.3.1.3. Oksidativni stres

Primarni izvor kisikovih reaktivnih vrsta (ROS) u sjemenoj plazmi su spermiji i preteče leukocita. Niže razine kisikovih reaktivnih vrsta su potrebne za normalnu funkciju spermija, sazrijevanje i akrosomalnu reakciju (de Lamirande i Gagnon 1995). U suprotnom slučaju, neispravni spermiji i infiltrirajući leukociti (uglavnom zbog upala u području testisa, epididimisa ili prostate) proizvode visoke nivoe kisikovih reaktivnih vrsta, prelazeći zaštitni kapacitet sjemene tekućine. Posljedični oksidativni stres povećava mogućnost DNA oštećenja, što može rezultirati slabom kvalitetom spermija, gubitkom sposobnosti akrosomalne reakcije, poteškoćama pri fuziji spermija i oocite te slabijom plodnosti, *in vivo* i *in vitro* (Erenpreiss i sur. 2002). Peroksidacija nezasićenih masnih kiselina u membranama spermija i DNA fragmentacija su uključeni u mehanizam pomoću kojeg kisikove reaktivne vrste uzrokuju DNA oštećenje i ometaju funkciju spermija (Kuhnert i Nieschlag 2004). Analiza markera za oksidativni stres i apoptozu pokazuju značajnu pozitivnu korelaciju između proizvodnje kisikovih reaktivnih vrsta, oksidativnog stresa i DNA oštećenja (fragmentacija i prisutnost jednolančane DNA). Mitohondriji kao osnovni izvor kisikovih reaktivnih vrsta uključeni su u aktivaciju proapoptotskih molekula, DNA fragmentaciju i apoptozu. Dok oksidativna oštećenja mitohondrijske DNA dovode do smanjene proizvodnje ATP utječući tako na reproduktivnu sposobnost (bitan utjecaj na pokretljivost), oštećenje jezgrine DNA je štetno za građu i funkciju spermija (Angelopoulou i Kyriazoglou 2005).

Varicocele (proširenje vena spermatičnog pleksusa) su bitan uzrok muške neplodnosti, iako su normalno prisutne u 15% muškaraca reproduktivne dobi (učinak na spermatogenezu je jasan, etiološki mehanizmi još uvijek nisu jasni). Infekcije genitalnog trakta mogu uzrokovati oštećenje DNA spermija i povezane su s visokim razinama kisikovih reaktivnih vrsta (Marmar 2001). Neplodni muškarci s varicocelama u usporedbi sa kontrolnim skupinama koje su prirodnim putem postigli trudnoću pokazuju značajno više razine oštećenja DNA spermija, zbog visoke razine kisikovih reaktivnih vrsta i povišene intratestikularne temperature (Saleh i sur. 2003). Kisikove reaktivne vrste mogu biti proizvedene i u sjemenim kanalićima pomoću citoplazmatskih kapljica sadržanih u nezrelim spermijima (Ollero i sur. 2001) te se čini da je to učestala osobina uzoraka spermija neplodnih muškaraca s varicocelama (Fischer i sur. 2003). Dakle, povišenje intratestikularne

temperature je također uzrok DNA oštećenja (povećanje histon/protamin odnosa) (Evenson i sur. 2000).

1.4. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je utvrditi kako su rezultati uobičajene metode analize ejakulata (pokretljivost, koncentracija i građa) povezani s rezultatima analize fragmentacije DNA spermija. Odnosno, utječe li oštećenje DNA spermija na prethodno navedene parametre te ako utječe, na koji način utječe.

Isto tako, bitno je i povezati životne navike (konzumiranje duhanskih proizvoda, lakih i teških droga, alkohola) ispitanika s kvalitetom spermija, kako bismo mogli dodatno pozitivno utjecati na plodnost muškaraca i djelovati preventivno na moguća oštećenja spermija.

Upravo zbog svega prethodno navedenog važno je razjasniti odnos između tradicionalne analize ejakulata i DNA fragmentacije spermija, upozoriti muškarce na moguće probleme uzrokovane načinom života te ih dodatno obrazovati o njihovoj plodnosti.

U ovom istraživanju je temeljna znanstvena pretpostavka (hipoteza) da su smanjena pokretljivost, koncentracija i građa humanih spermija međusobno povezani s povećanom DNA fragmentacijom spermija.

2. MATERIJALI I METODE

Ovo istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa: 641-01/14-02/01), koje provjerava i nadzire jesu li u predloženom znanstvenom istraživanju na ljudskim ispitanicima poštivana i primijenjena etička i profesionalna načela kojih se svi istraživači moraju pridržavati.

2.1. Ispitanici

Uzorak ejakulata je donirao 41 muškarac, nakon što su pročitali Obavijest za ispitanika u kojem je objašnjena hipoteza, cilj i svrha istraživanja te njihova uloga i rizici, kao i tko organizira i tko je odgovoran za istraživanje te u koju svrhu će se rezultati istraživanja koristiti. Ispitanici su potpisali Suglasnost za ispitanika u kojoj izjavljuju da su navedenog dana donirali uzorak, pročitali Obavijest za ispitanika, dobrovoljno pristupili istraživanju, razumiju što se od njih očekuje te da žele i pristaju sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Tijekom uzimanja anamneze (konzumiranje alkohola, cigareta, *Cannabis*, dob) ispitanici su dobili sterilnu čašicu za uzorak ejakulata sa nasumičnim brojem pod kojim će se voditi njihov uzorak i podaci, kako bi se zaštitio njihov identitet.

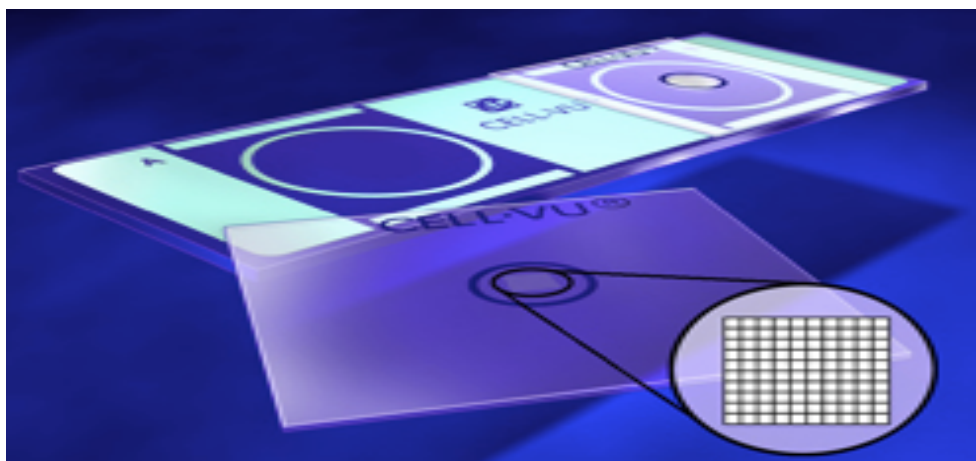
Od 41 uzorka, 37 uzoraka je prošlo kompletnu analizu. Jedan uzorak je pao na dno spermnika za tekući dušik, a tri uzorka nismo mogli analizirati komet testom.

2.2. Analiza ejakulata - spermogram

Uzorci ejakulata su dobiveni masturbacijom nakon 2-7 dana apstinencije i ejakulirani u čistu i sterilnu plastičnu čašicu (VWR, SAD), širokog otvora i netoksičnu za spermije. Nakon sjemene likvefakcije (proces homogeniziranja ejakulata) analizirana je pokretljivost, koncentracija i građa kroz jedan sat od same ejakulacije, prema napomenama WHO (World Health Organization) 2010. Neobrađeni ejakulat je čuvan u spremniku sa tekućim dušikom (MVE-XC3418, SAD) do obrade komet testom kako bismo ustanovili oštećenja DNA spermija.

2.2.1. Određivanje koncentracija spermija

Kako bi se zadržala homogenost ejakulata, uzorak se resuspendira nekoliko puta pomoću šprice 1 ml (Terumo, Njemačka) i igle (0,9 x 50) ml (Tik, Slovenija), prije same analize. Na DRM-600 (CELL-VU, SAD) predmetno stakalce za brojanje spermija nanese se mikropipetom (LLG, Njemačka) 20 μ L uzorka te se poklopi pokrovnicom sa komoricama (CELL-VU, SAD) za brojanje (Slika 6). Uzorak se analizira na fazno-kontrastnom mikroskopu (Nikon, Japan) (povećanje 200 \times), sa izoliranom koordinatnom mrežom (100 komorica, svaka 0,1 x 0,1 mm, određuje se broj spermija u deset komorica te se ukupni broj podijeli sa dva i dobije se koncentracija spermija u milijunima/ml) na pokrovnici.



Slika 6. Predmetno stakalce DRM-600 sa pokrovnicom sa komoricama za brojanje (CELL-VU, SAD).

Donja granica za koncentraciju spermija iznosi 15×10^6 / ml (5. centil, 95% interval pouzdanosti $12 - 16 \times 10^6$). Oligozoospermija je stanje pri kojem je koncentracija spermija manja od donje granice.

2.2.2. Određivanje pokretljivosti spermija

Kategorije pokretljivosti spermija:

Progresivna pokretljivost (PR) - spermiji se aktivno gibaju, linearno ili u velikim kružnicama, neovisno o brzini

Neprogresivna pokretljivost (NP) - svi oblici pokretljivosti s odsustvom napredovanja; titranje glave, trzaji repa, plivanje u malim kružnicama

Nepokretljivost (IM) - bez kretanja

PR + NP - ukupna pokretljivost

Određuje se kategorija pokretljivosti s prioritetom nepokretljivosti i neprogresivne pokretljivosti jer spermiji s progresivnom pokretljivošću brzo mijenjaju komorice, zbog čega je iznimno teško precizno odrediti njihovu brojnost. Nakon što se izbroje oni nepokretni i neprogresivno pokretni, s obzirom da se prethodno izračunala koncentracija, po formuli $\%(\text{NP ili IM}) = [\text{N(NP ili IM)/konc.}] \times 100$ izračunamo postotak nepokretnih i neprogresivno pokretnih, nakon čega oduzmemo zbroj tih postotaka od 100% i dobijemo postotak progresivno pokretnih.

Donja granica za ukupnu pokretljivost (PR + NP) iznosi 40% (5. centil, 95% interval pouzdanosti 38-42).

Donja granica za progresivnu pokretljivost iznosi 32% (5. centil, 95% interval pouzdanosti 31-34). Asthenozoospermija je stanje pri kojem je postotak PR spermija ispod donje granice.

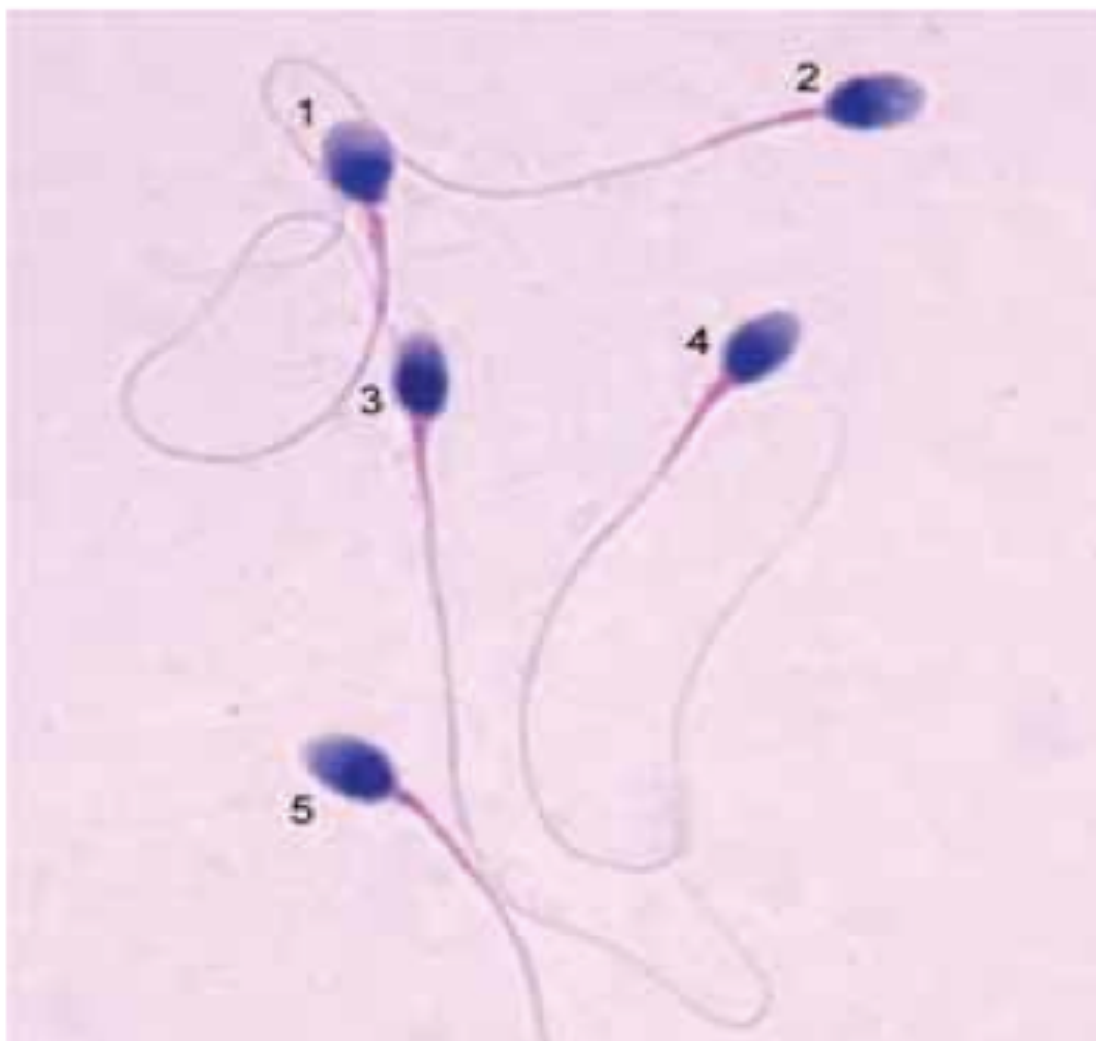

2.2.3. Određivanje građe spermija

Kako bi se zadržala homogenost ejakulata, uzorak se resuspendira nekoliko puta pomoću šprice 1 ml (Terumo, Njemačka) i igle (0,9 x 50)ml (Tik, Slovenija), prije same analize. Na prethodno obojano DRM-900 predmetno stakalce (CELL-VU, SAD) za određivanje građe spermija nanese se mikropipetom (LLG, Njemačka) 20 µL uzorka te se poklopi pokrovnicom (Biosigma, Njemačka). Uzorak se analizira na fazno-kontrastnom mikroskopu (Nikon, Japan) (povećanje x400). Određuje se broj ukupnih spermija u 400 i izražava se postotak normalnih prema formuli $\%(\text{normalnih}) = N(\text{normalnih}) \times 100 / 400$.

DRM-900 prethodno obojana predmetna stakalca sastoje se od uobičajenog mikroskopskog predmetnog stakalca premazanog metilen plavom i krezil ljubičastom bojom te su dizajnirana za brzo bojanje i određivanje građe (glava, akromosom, rep) spermija.

Normalan spermij mora imati i glavu i rep normalne, a svaki granični oblici smatraju se abnormalnima (Slika 7). Glava mora biti glatka, pravilno oblikovana, ovalnog oblika. Akrosomalna regija mora biti jasno definirana zauzimajući 40-70% glave. Ne smije sadržavati velike vakuole, kao niti više od dvije male vakuole, koje ne smiju zauzimati više od 20% glave. Regija iza akrosoma ne smije sadržavati vakuole. Srednji dio mora biti vitak, pravilan i otprilike jednake duljine kao i glava. Glavna os srednjeg dijela mora biti poravnata sa glavnom osi glave, a ostaci citoplazme se smatraju normalnima dok ne prelaze volumen jedne trećine glave. Rep mora biti pravilan tijekom cijele duljine, tanji od srednjeg dijela i dugačak otprilike 45 µm; može biti zaobljen, no bez oštih kutova koji bi mogli upućivati na lom.

10 microns



Slika 7. Obojani spermiji; 1 - normalan spermij, 2 - abnormalan spermij (>2 vakuole u glavi), 3 - abnormalan spermij (sužena glava), 4 - normalan spermij, 5 - normalan spermij (WHO, 2010).

Donja granica za normalne spermije iznositi 4% (5. centil, 95% interval pouzdanosti 3,0-4,0). Teratozoospermija je stanje pri kojem je postotak normalnih spermija ispod donje granice.

2.2.4. Zamrzavanje ejakulata

Uzorci ejakulata od 1 ml su sakupljeni u krio cjevčice 2ml (Greiner Bio-One, Austrija) bez krioprotektanta te stavljeni u CryoFlex polietilenske cjevčice (Thermo Scientific Nunc, SAD), kako bi se osigurala dodatna zaštita od kontaminacije mogućim patogenima (donori nisu prošli pretrage na zarazne bolesti). Uzorci su zamrzavani bez krioprotektanta kako ne bi utjecao na točnost komet testa (utišavanje signala). Krio cjevčice 2 ml (Greiner Bio-One, Austrija) se stave u CryoFlex polietilenske cjevčice (Thermo Scientific Nunc, SAD) te zavare na krajevima termičkom obradom pomoću uređaja za zavarivanje plastike (Melag, Njemačka). Tako osigurani uzorci se ostave 10 min na 10 cm od razine tekućeg dušika ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), nakon čega se urone u tekući dušik ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) u za to predviđenim nosačima (MVE, SAD), do potrebe za daljnjom analizom.

2.2.5. Odmrzavanje ejakulata

Prije same analize uzoraka, uzorci se izvade iz tekućeg dušika i ostave na sobnoj temperaturi 1 min, izvade iz CryoFlex polietilenskih cjevčica (Thermo Scientific Nunc, SAD) te urone u vodenu kupelj na 37°C dok se potpuno ne odmrznu. Nakon odmrzavanja uzorci se pomiješaju sa određenim volumenom PBS-a kako bismo postigli željeno razrjeđenje potrebno za analize koje slijede.

2.2.6. Komet test

U ovom istraživanju za utvrđivanje primarnih oštećenja DNA u spermijima korištena je izvedba komet testa u alkalnim uvjetima koji omogućuju specifično otkrivanje jednolančanih lomova i mjesta osjetljivih na lužine (apurinska i apirimidinska mjesta nastala kao posljedica oštećenja molekule DNA), praćenje popravka stanične DNA te otkrivanje stanica u apoptozi i nekrotičnih stanica. Sve kemikalije korištene u ovom komet testu su proizvođača Sigma, SAD.

Na brušena predmetna stakla (Surgipath, SAD) nanese se sloj 1 %-tne svježe pripremljene otopine agaroze normalnog tališta [NMP agaroze (od engl. normal melting point)]. Nakon polimerizacije agaroze nanosi se sljedeći sloj koji se sastoji od 5 μ L uzorka spermija pomiješanog sa 100 μ L 0,5 %-tne agaroze niskog tališta [LMP agaroze (od engl. low melting point)]. Nakon desetominutnog hlađenja na ledu nanosi se novi sloj 0,5 %-tne LMP agaroze (100 μ L) i ponovno ostavi na ledu 10 minuta. Zatim se uklanja pokrovnica (Biosigma, Njemačka), a preparati uranjaju u hladnu otopinu za liziranje staničnih membrana [100 mM Na₂EDTA; 2,5 M NaCl ; 10 mM Tris-HCl; 1% natrijev sarkozinat, podešen na pH 10 s 1% Triton X-100, 10% DMSO (dimetil sulfoksid) i 0,05 mg/ml proteinaza K dodana neposredno prije upotrebe] i drži na temperaturi od 37 °C tijekom 24 sata. Nakon završenog liziranja, preparati se poslože u kadu za elektroforezu (BIO-RAD, SAD) napunjenu puferom [300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA], pH 13,5 i inkubiraju 20 minuta. To uzrokuje odmatanje DNA i otkrivanje mjesta osjetljivih na lužine. Elektroforeza se vrši tijekom 20 minuta u istom puferu istosmjernom strujom stalne jakosti od 300 mA i napona 24 V. Neutraliziranje preparata nakon elektroforeze vrši se ispiranjem s 0,4 M Tris-HCl puferom (pH 7,5), tri puta po pet minuta. Nakon neutralizacije preparati se boje etidijevim bromidom 20 μ g/ml i pregledavaju pod epifluorescencijskim mikroskopom (Opton, Njemačka) s ekscitacijskim filterom 515 nm – 560 nm uz povećanje 400 x te korištenje računalnog sustava za analizu slike Comet assay IV (Perceptive Instruments Ltd.). Mjeri se najmanje 50 kometa na kojima se utvrđuju tri osnovna parametra: dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment. Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći odlomljeni fragmenti DNA; obično se mjeri od sredine glave kometa ili od ruba glave i izražava u mikrometrima. Intenzitet repa označava postotak DNA koja je migrirala u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni

moment se obično definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu, a izračunava ga prethodno navedeni računalni program.

Oštećenje DNA spermija <15% smatra se vrlo dobrim rezultatom, 15-30% dobrim rezultatom, a >30% lošim rezultatom (loša kvaliteta spermija).

2.3. Statistička obrada

Statistička obrada provesti će se pomoću statističkog računalnog softverskog paketa STATISTICA 9.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD; za Windows). Dobiveni rezultati biti će opisani parametrima deskriptivne statistike: medijanom, minimalnom i maksimalnom vrijednošću te standardnom devijacijom. Za normalizaciju rezultata, vrijednosti parametra komet testa biti će logaritmirane prije daljnje obrade. Za statističku obradu rezultata dobivenih u istraživanju komet testom koristi se test Break-down Anova analiza sa post hoc Scheffeovom modifikacijom.

Statistička obrada parametara utjecaja načina života na kvalitetu spermija (tradicionalna analiza ejakulata), parametara tradicionalne analize ejakulata i DNA fragmentacije spermija provodi se two-tailed t-testom (p-vrijednost <0,05 smatra se statistički značajnom), dok se odnos između DNA fragmentacije spermija i parametara tradicionalne analize ejakulata provodi Pearsonovom korelacijom.

3. REZULTATI

3.1. Korelacija DFI spermija i sjemenih parametara

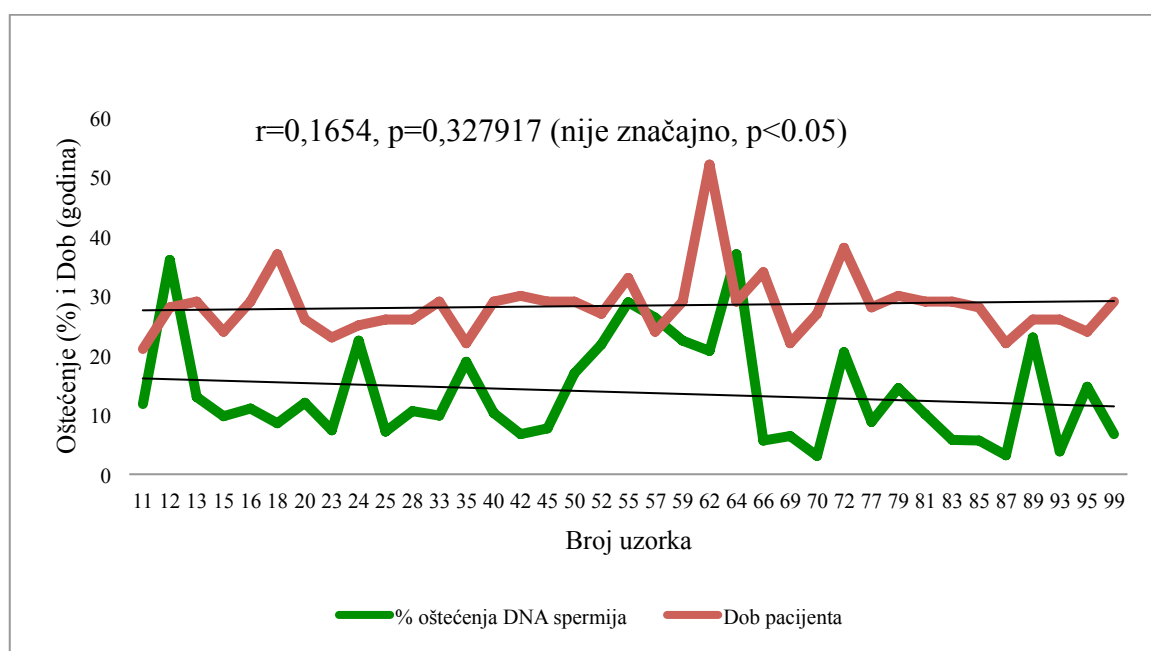
Korelacija indeksa fragmentacije DNA (DFI) spermija i sjemenih parametara istraжена je u 37 različitih uzoraka ejakulata (Tablica 1). Stupanj korelacije je određen koeficijentom korelacije (r) i p -vrijednosti. Indeks fragmentacije DNA spermija raste značajno kako raste postotak normalne građe ($r=0,3539$, $p=0,031643$), dok za ostale sjemenne parametre (progresivna pokretljivost $r=-0,0037$, $p=0,98594$; koncentracija $r=0,1607$, $p=0,342039$; dob $r=0,1654$, $p=0,327917$) i DFI spermija nije utvrđena značajna povezanost (Slika 8).

Tablica 1. Svojstva i vrijednosti nativnog ejakulata ispitanika ($n=37$).

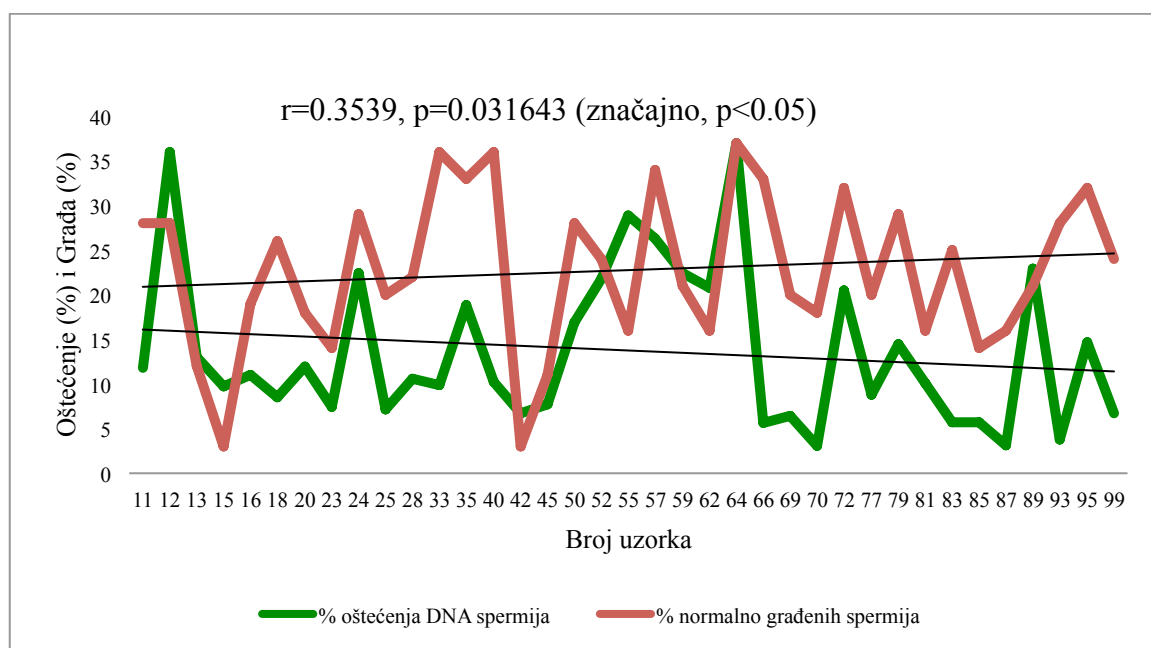
	Med	Min	Max	AS \pm SD
DFI (%)	10,6	3,1	37,0	13,8 \pm 8,8
Progresivna pokretljivost (%)	42	0	70	42,3 \pm 15,9
Normalna građa (%)	22	3	37	22,8 \pm 8,7
Koncentracija ($\times 10^6$/ml)	43	7	89	42,6 \pm 16,7
Dob (godina)	28	21	52	28,3 \pm 5,5

Med = medijan, Min = minimum, Max = maksimum, AS = aritmetička sredina, SD = standardna devijacija.

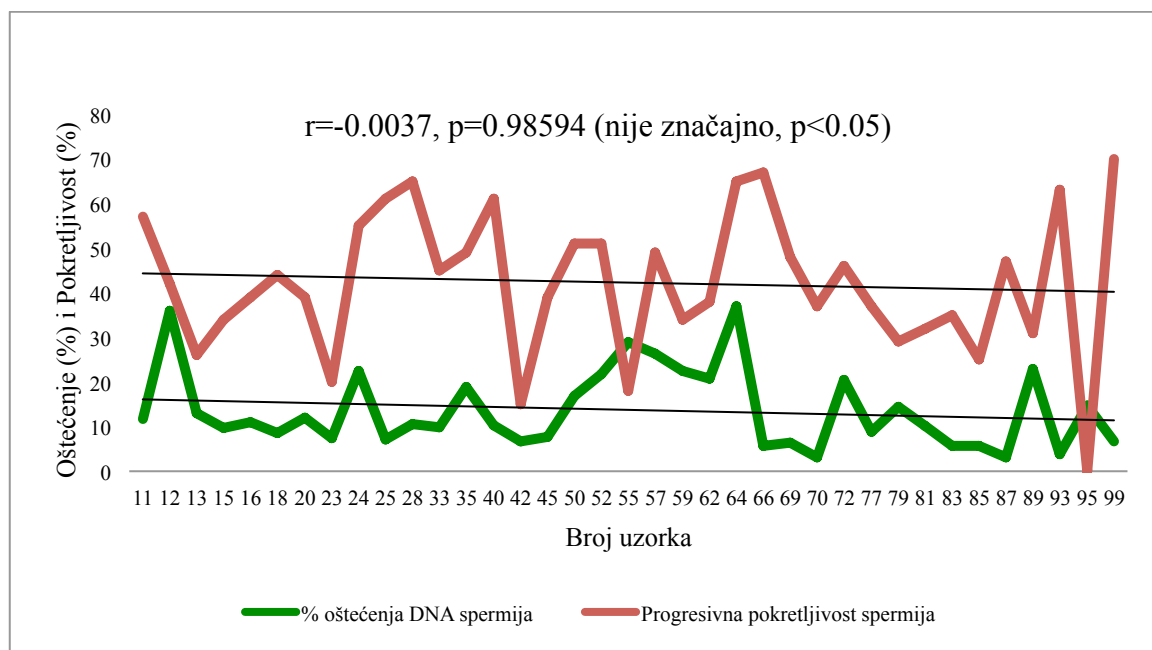
A



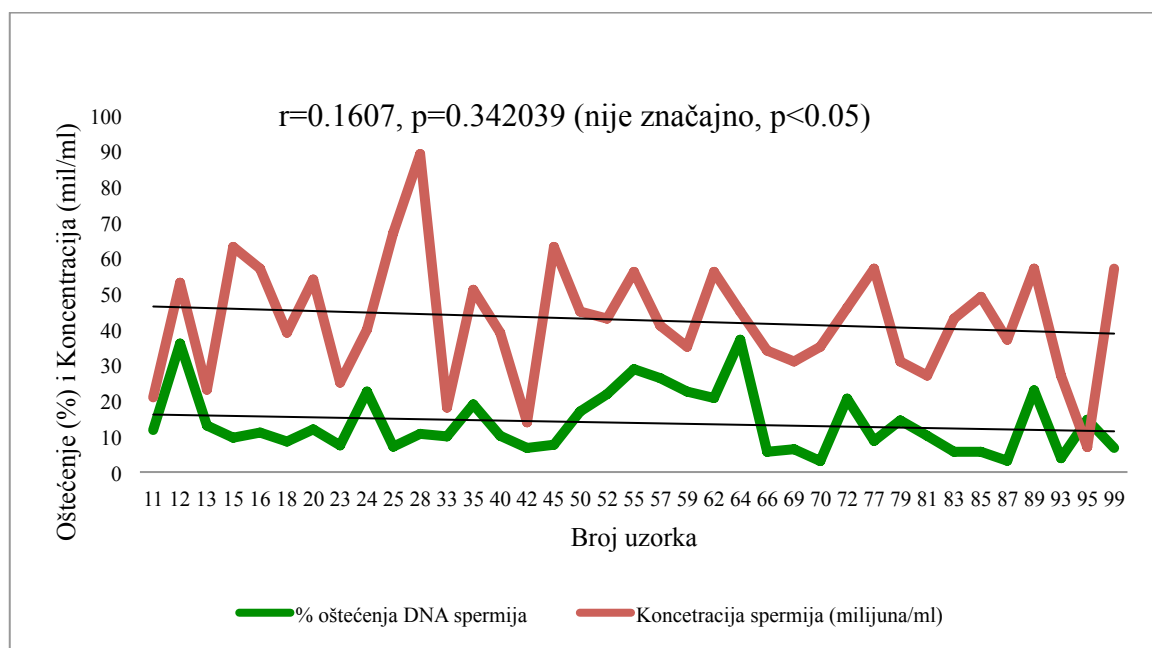
B



C



D



Slika 8. Korelacija između sjemenih parametara i indeksa DNA fragmentacije (DFI) spermija utvrđena koristeći alkalni komet test u 37 različitih uzoraka ejakulata. A-povezanost DFI spermija i dobi pacijenta, B-povezanost DFI spermija i normalne građe spermija, C-povezanost DFI spermija i progresivne pokretljivosti spermija, D-povezanost DFI spermija i koncentracije spermija. $p<0,05$ smatralo se statistički značajno, r = koeficijent.

3.2. Kvalitativni prag DFI spermija

Na temelju moguće povezanosti cjelovitosti DNA spermija i tradicionalne analize ejakulata, koristio se DFI od 15% kao kvalitativni prag oštećenja DNA spermija. Podijelivši 37 uzoraka ejakulata u dvije grupe (<15% i ≥15%), utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između sjemenih parametara u grupi <15% i u grupi ≥15% (Tablica 2).

Tablica 2. Povezanost grupa kvalitativnog praga DFI spermija na temelju sjemenih parametara. $p < 0,05$ smatralo se statistički značajnim. Vrijednosti sjemenih parametara su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija.

Sjemeni parametri	DFI spermija <15% grupa	DFI spermija ≥15% grupa	Značajnost
Progresivna pokretljivost (%)	41,4 \pm 17,5	44,1 \pm 12,4	p=0,638 (NS)
Normalna građa (%)	20,9 \pm 9,0	26,6 \pm 7,0	p=0,063 (NS)
Koncentracija (x 10 ⁶ /ml)	40,3 \pm 19,4	47,3 \pm 7,2	p=0,233 (NS)
Dob (godina)	27,4 \pm 3,7	30,2 \pm 8,1	p=0,162 (NS)

NS = nije značajno, S = značajno, DFI = indeks fragmentacije DNA spermija.

3.3. Usporedba normozoospermije sa dijagnozom astheno/oligo/teratozoospermije

Na temelju moguće povezanosti sjemenih parametara uzoraka ejakulata sa dijagnozom normozoospermije i dijagnozom subfertilnosti (astheno/oligo/teratozoospermija), podijeljeni su uzorci u dvije grupe. Utvrđeno je da postoji značajna statistička razlika između navedenih skupina kad su u pitanju progresivna pokretljivost i normalna građa, dok za ostale parametre nije utvrđena statistički značajna razlika (Tablica 3).

Tablica 3. Povezanost grupe uzoraka sa astheno/oligo/teratozoospermijom i grupe sa normozoospermijom na temelju sjemenih parametara. $p < 0,05$ smatralo se statistički značajnim. Vrijednosti sjemenih parametara su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija.

	Dijagnoza grupe		
Parametri	Astheno/oligo/ teratozoospermija	Normozoospermija	Značajnost
DNA u repu kometa (%)	12,6 \pm 13,3	13,6 \pm 14,0	NS
Duljina repa kometa (μ m)	13,4 \pm 3,6	13,0 \pm 4,1	S (p=0,021)
Repni moment (%)	1,1 \pm 1,4	1,2 \pm 1,5	S (p=0,015)

NS = nije značajno, S = značajno.

3.4. Životne navike

Na temelju moguće povezanosti životnih navika i sjemenih parametara, podijeljeni su uzorci ejakulata u slijedeće grupe: osobe koje konzumiraju >10 cigareta dnevno, >2 alkoholna pića dnevno, >10 cigareta i >2 alkoholna pića dnevno, *Cannabis* ≥ 3 puta tjedno. Navedene grupe su uspoređene sa kontrolnim grupama uzoraka ejakulata muškaraca koji ne konzumiraju cigarete, alkohol i *Cannabis* (Tablica 4). Utvrđena je statistički značajna razlika između grupe >2 alkoholna pića dnevno i kontrolne grupe na temelju progresivne pokretljivosti i koncentracije; između grupa >10 cigareta dnevno i >2 alkoholna pića dnevno te kontrolne grupe na temelju progresivne pokretljivosti. Kod ostalih grupa na temelju sjemenih parametara nije utvrđena statistički značajna razlika (Tablica 5).

Tablica 4. Povezanost životnih navika i sjemenih parametara (prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija).

Životne navike	Sjemeni parametri				
	DFI spermija (%)	Progresivna pokretljivost (%)	Normalna građa (%)	Koncentracija (x 10 ⁶ /ml)	Dob (godina)
CIG grupa	13,0 \pm 6,4	41,9 \pm 13,1	19,7 \pm 9,4	44,7 \pm 14,7	27,4 \pm 4,3
ALK grupa	14,1 \pm 6,7	34,5 \pm 16,1	21,7 \pm 8,8	34,6 \pm 15,7	27,6 \pm 5,2
CIG +ALK grupa	13,3 \pm 6,6	36,4 \pm 15,8	20,2 9,1	38,7 \pm 16,8	27,3 \pm 4,5
CBS grupa	17,3 \pm 10,3	42,1 \pm 16,2	26,9 \pm 7,6	38,4 \pm 13,5	26,9 \pm 5,6
Kontrolna grupa	12,9 \pm 9,6	47,9 \pm 13,8	24,2 \pm 7,7	47,2 \pm 16,6	29,3 \pm 6,7

DFI = indeks fragmentacije DNA spermija, CIG= >10 cigareta dnevno, ALK = >2 alkoholna pića dnevno, CIG + ALK = >2 cigarete dnevno + >2 alkoholna pića dnevno, CBS = ≥ 3 puta tjedno *Cannabis*.

Tablica 5. Povezanost grupe određenih životnih navika sa kontrolnom grupom na temelju sjemenih parametara. $p < 0,05$ smatralo se statistički značajnim.

Životne navike	Sjemeni parametri				
	DFI spermija	Progresivna pokretljivost	Normalna građa	Koncentracija	Dob
CIG grupa / Kontrolna grupa	NS	NS	NS	NS	NS
ALK grupa / Kontrolna grupa	NS	S ($p=0,021$)	NS	S ($p=0,0438$)	NS
CIG + ALK grupa / Kontrolna grupa	NS	S ($p=0,03$)	NS	NS	NS
CBS grupa / Kontrolna grupa	NS	NS	NS	NS	NS
Značajnost					

NS = nije značajno, S = značajno, DFI = indeks fragmentacije DNA spermija. CIG= >10 cigareta dnevno, ALK = >2 alkoholna pića dnevno, CIG + ALK = >2 cigarete dnevno + >2 alkoholna pića dnevno, CBS = ≥ 3 puta tjedno *Cannabis*.

4. RASPRAVA

Muška neplodnost je povezana sa slabom cjelovitosti DNA spermija te je predloženo da takve DNA abnormalnosti mogu utjecati na razmnožavanje parova prirodnim putem, kao i medicinskom oplodnjom. Isto tako, fragmentirana DNA je česta pojava kod parova koji imaju ponavljajuće pobačaje (Bungum i sur. 2004; Virro i sur. 2004). Također postoji i jak klinički dokaz da kombinacija povećane fragmentacije DNA spermija zajedno sa standardnim sjemenim parametrima imaju jasan utjecaj na reproduktivnu mogućnost (Angelopoulou i sur. 2007; Li i sur. 2005). Nadalje, za vrijednosti DNA fragmentacije spermija iznad 10% postoji značajna negativna korelacija sa uspješnim oplodnjama (Benchai i sur. 2003). Neke studije su pokazale da nema jasnog odnosa između DNA fragmentacije spermija i reproduktivnog ishoda. S obzirom da genom zametka nije izražen sve do nakon druge podjele blastociste, logično je zaključiti da oštećenje DNA spermija ne utječe na oplodnju ili razvoj embrija do navedenog trenutka. Odnosno, samo oštećenje DNA spermija ne utječe na nastanak zametka, već na daljnji razvoj i sudbinu ploda (Benchai i sur. 2007; Acharyya i sur. 2005; Angelopoulou i sur. 2007).

U zadnjih nekoliko godina mnoge studije su pokušale objasniti povezanost DNA fragmentacije spermija i uobičajenih sjemenih parametara, dovodeći do dvosmislenih rezultata. Većina studija su utvrdile obrnutu povezanost fragmentiranosti DNA i kvalitete spermija za koncentraciju, pokretljivost, građu i dob (Acharyya i sur. 2005; Wyrobek i sur. 2006). Značajna obrnuta povezanost je ustanovljena između postotka normalno građenih spermija i fragmentacije DNA. Nepravilni kromatin i puknuća lanaca DNA povezani su sa teškim oblicima nepravilne građe, poput megalocfalije i višestrukih repova sa disomijom. Isto tako, specifični uzorci građe, poput suženih glava koje su povezane sa gubitkom trudnoće, također pokazuju znatnu fragmentiranost DNA spermija (Evgeni i sur. 2014). S druge strane, neke studije nisu utvrdile značajnu povezanost između tradicionalnih sjemenih parametara (građa, pokretljivost, koncentracija, dob) i fragmentacije DNA (Lin i sur. 2008; Xia i sur. 2005; Karydis i sur. 2005). Spermiji sa normalnim karakteristikama prema WHO imali su oštećenu DNA (Sakkas i Alvarez 2010; Huszar i sur. 2007; Benchai i sur. 2007). Isto tako, specifične grupe pacijenata nisu imale loše tradicionalne sjemenne parametre, a imali su kromosomske aberacije i slično (Sun i sur. 2006). U ovome istraživanju utvrđeno je da DFI spermija raste značajno kako raste postotak normalno građenih spermija, dok za korelaciju između DFI spermija i progresivne pokretljivosti, koncentracije i dobi pacijenta

nije utvrđena statistička značajnost. Oštećenje DNA je značajno povećano kod muškaraca sa lošom kvalitetom ejakulata naspram onih s normalnim uzorcima ejakulata. Vrijednosti pokretljivosti, građe i koncentracije kod uzoraka sa oštećenjem DNA $<15\%$ značajno su više, nego kod uzoraka sa oštećenjem $\geq 15\%$. Takve spoznaje su slične izvještajima kod kojih su spermiji lošije kvalitete karakteristični za veća oštećenja DNA (Caglar i sur. 2007; Kalthur i sur. 2008). Između grupa $<15\%$ i $\geq 15\%$ DFI spermija u ovome istraživanju nema statistički značajne razlike u progresivnoj pokretljivosti, koncentraciji i građi spermija te dobi pacijenta. Kvalitativne grupe sjemenih parametara (prema WHO smjernicama) nisu pokazale statistički značajne razlike na temelju DFI spermija.

Pacijenti sa subfertilnom dijagnozom, odnosno bilo kojim kombinacijama astheno/oligo/teratozoospermije, pokazali su statistički značajno veći DFI spermija, u odnosu prema pacijentima sa normozoospermijom (Chi i sur. 2011; Shamsi i sur. 2009); dok u našem istraživanju pacijenti sa subfertilnom dijagnozom nisu pokazali nikakvu statistički značajnu razliku naspram onih sa normozoospermijom na temelju postotka DNA u repu kometa, a statistički značajna razlika je uočena na temelju duljine kometa i repnog momenta.

Skupine pacijenata koji svakodnevno konzumiraju duhanske proizvode, naspram skupine koja ne konzumira duhanske proizvode, nisu pokazale statistički značajne rezultate prema sjemenim parametrima niti značajnu korelaciju prema DFI spermija što je u skladu sa nekim istraživanjima (Wogatzky i sur. 2012; Oldereid i sur. 1992). S druge strane, neka istraživanja pokazuju značajno smanjenje pokretljivosti, lošiju morfologiju te povećanje DFI spermija za skupine pacijenata koji svakodnevno konzumiraju duhanske proizvode (Mitra i sur. 2012; Wegner i sur. 2010).

Svakodnevno konzumiranje alkohola nije pokazalo štetan utjecaj na kvalitetu spermija niti značajnu razliku naspram pacijenata koji ne konzumiraju alkohol (Wogatzky i sur. 2012; Oldereid i sur. 1992), dok je značajno smanjenje kvalitete spermija kod konzumenata alkohola, smanjenjem pokretljivosti i normalne građe te povećanjem DFI spermija, ustanovljeno kod Mitre i sur. (2012) te Wegnera i sur. (2010). Ovo istraživanje je utvrdilo značajne razlike između konzumenata i nekonzumenata alkohola prema pokretljivosti i koncentraciji spermija, odnosno kod konzumenata alkohola progresivna pokretljivost i koncentracija spermija su značajno smanjeni.

Pacey i sur. (2014) su utvrdili da konzumiranje pripravaka biljke *Cannabis* značajno negativno utječe na kvalitetu spermija, a Povey i sur. (2012) su utvrdili da ne utječe značajno na kvalitetu spermija. Zanimljivo je da su u oba istraživanja u grupu korisnika

pripravaka biljke *Cannabis* stavljali ispitanike koji su jednom ili svakodnevno u tri mjeseca koristili isto, što je neprihvatljivo zbog neuniformnosti grupe (prevelika je razlika u frekvenciji konzumiranja, a time i u učinku na organizam), kao i da su oba voditelja istraživanja sudjelovali u oba istraživanja. Ovo istraživanje je pokazalo da nema statistički značajnih rezultata sjemenih parametara između skupine konzumenata pripravaka bilje *Cannabis* tri ili više puta tjedno, naspram skupine koja ne konzumira *Cannabis*.

Prethodno navedeni rezultati su veoma različiti i dvosmisleni zbog više razloga:

- različitost metoda korištenih za određivanje cjelovitosti DNA spermija; većina studija određuje oštećenje DNA različitim metodama, čime uglavnom utvrđuju različita gledišta oštećenja DNA i ne daju uvijek usporedive rezultate

- različitost kriterija i metodologije primijenjene u analizi tradicionalnih sjemenih parametara; različite tehnike se koriste za određivanje brojnosti spermija (komorice za brojanje) i za određivanje građe spermija (već obojana stakalca ili različite metode bojenja), što utječe na preciznost rezultata; isto tako, korištenje različitih smjernica (npr. WHO 1999 ili WHO 2010) u mnogim studijama može rezultirati zbunjenošću u referentnim granicama koje određuju "normalno"

- kontrola kvalitete pri analizi sjemenih parametara; rijetko se spominje u studijama analize ejakulata jesu li laboratoriji prošli vanjska testiranja kvalitete, kako bi se osigurala preciznost, pouzdanost i umanjila subjektivnost rezultata

- nedostatak uniformnosti u kriterijima odabira populacijskih grupa jer različite podgrupe pacijenata ne mogu uvijek biti usporedive

U svjetlu znanstvenih podataka akumuliranih tijekom posljednjih desetljeća u pogledu važnosti cjelovitosti DNA spermija muškog reproduktivnog potencijala, standardiziran i detaljan pregled oštećenja DNA spermija može s pravom biti uključen u sveobuhvatnu analizu neplodnosti para. Poznato je kroz kliničko iskustvo i studije da postoje varijacije u koncentraciji spermija, kako unutar pojedine jedinke, tako i između različitih jedinki iste vrste. Upravo zbog navedenoga trebalo bi analizirati više uzoraka ejakulata pojedine jedinke kako bismo dobili pouzdaniji rezultat kvalitete spermija (Mallidis i sur. 2009, MacLeod i Gold 1956, Carlsen i sur. 2004). Dakako, dogovor o različitim pitanjima koja se odnose na izbor optimalnog testa te protokole i najvažnije pragove koji će odrediti klinički značaj i prognostičku vrijednost rezultata još treba riješiti. Dakle, budućnost dijagnostike muške neplodnosti leži na učinkovitoj kombinaciji informacija dobivenih od tradicionalnih sjemenih parametara i cjelovitosti genoma spermija.

5. ZAKLJUČCI

Indeks fragmentacije DNA spermija značajno raste kako raste postotak normalno građenih spermija.

Indeks fragmentacije DNA spermija ne pokazuje značajnu korelaciju prema progresivnoj pokretljivosti i koncentraciji spermija te dobi ispitanika.

Indeks fragmentacije DNA spermija ne utječe na progresivnu pokretljivost, normalnu građu i koncentraciju spermija te nema značajne razlike u DFI spermija kad je u pitanju dob ispitanika. Isto tako, navedeni sjemeni parametri na utječu na DFI spermija.

Dob ispitanika ne utječe na kvalitetu sjemenih parametara.

Konzumiranje više od dva alkoholna pića dnevno značajno smanjuje progresivnu pokretljivost i koncentraciju spermija, dok na normalnu građu i indeks fragmentacije DNA spermija ne utječe značajno.

Konzumiranje više od deset cigareta dnevno, kao i konzumiranje pripravaka biljke *Cannabis* više od tri puta tjedno, ne utječe značajno niti na jedan od sjemenih parametara.

Istovremeno konzumiranje više od dva alkoholna pića dnevno i više od deset cigareta dnevno značajno smanjuje progresivnu pokretljivost spermija, dok na ostale sjemenne parametre ne utječe značajno.

6. LITERATURA

- Abu-Hassan D., Koester F., Shoepper B., Schultze-Mosgau A., Asimakopoulos B., Diedrich K., Al-Hasani S. 2006. Comet assay of cumulus cells and spermatozoa DNA status, and the relationship to oocyte fertilization and embryo quality following ICSI. *Reproductive Biomedicine Online* **12**(4), 447–452.
- Acharyya S., Kanjilal S., Bhattacharyya A.K. 2005. Does human sperm nuclear DNA integrity affect embryo quality? *Indian Journal of Experimental Biology* **43**(11), 1016-1022.
- Ahmad L., Jalali S., Shami S.A., Akram Z. 2007. Sperm preparation: DNA damage by comet assay in normo- and teratozoospermics. *Archives of Andrology* **53**, 325–338.
- Aitken R.J., De Iuliis G.N. 2007. Value of DNA integrity assays for fertility evaluation. *Society for Reproduction and Fertility* **65**, 81–92.
- Andrade-Rocha F.T. 2003. Semen analysis in laboratory practice: an overview of routine tests. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **17**(6), 247-258.
- Angelopoulou R., Plastira K., Msaouel P. 2007. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reproductive Biology and Endocrinology* **5**, 36.
- Angelopoulou R., Kyriazoglou M. 2005. Sperm oxidative damage and the role of reactive oxygen species in male infertility. *Archives of Hellenic Medicine* **22**, 433-446.
- Aoki V.W., Liu L., Carrel D.T. 2005. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Human Reproduction* **20**, 1298-1306.
- Balhorn R., Cosman M., Thornton K. 1999. Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In *The male gamete: From Basic Science to Clinical Applications* Edited by: Gagnon C. Vienna. IL: Cache River Press 55-70.
- Baum J.S., St. George J.P., McCall K. 2005. Programmed cell death in the germline. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **16**, 245-259.
- Benchab M., Braun V., Lornage J., Hadj S., Salle B., Lejeune H., Guerin J.F. 2003. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction* **18**, 1023–1028.

- Benchaib M., Lornage J., Mazoyer C., Lejeune H., Salle B., Francois Guerin J. 2007. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility* **87**(1), 93-100.
- Boissonneault G. 2002. Chromatin remodelling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Letters* **514**(2-3), 111-114.
- Bungum M., Humaidan P., Spano M., Jepson K., Bungum L., Giwercman A. 2004. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reproduction* **19**, 1401-1408.
- Caglar G.S., Köster F., Schöpper B., Asimakopoulos B., Nehls B., Nikolettos N., Diedrich K., Al-Hasani S. 2007. Semen DNA fragmentation index, evaluated with both TUNEL and Comet assay, and the ICSI outcome. *In Vivo* **21**, 1075–1080.
- Carlsen E., Petersen J. H., Andersson A.M., Skakkebaek N.E. 2004. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertility and Sterility* **82**(2), 358-366.
- Carlson B.M. 2013. *Human Embryology and Developmental Biology*, 5th Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA.
- Caron N., Veilleux S., Boissonneault G. 2001. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TPI protein. *Molecular Reproduction and Development* **58**, 437-443.
- Carrel D.T., Wilcox A.L., Lowy L., Peterson C.M., Jones K.P., Erickson L., Campbell B., Branch D.W., Hatasaka H.H. 2003. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstetrics and Gynecology* **101**(6), 1229-1235.
- Chi H.J., Chung D.Y, Choi S.Y., Kim J.H., Kim G.Y., Lee J.S., Lee H.S., Kim M.H., Roh S. I. 2011. Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *CERM* **38**(1), 10-17.
- Cooper T.G., Keck C., Oberdieck U., Nieschlag E. 1993. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Human Reproduction* **8**, 1251-1258.
- De Palma A., Vicari E., Palermo I., D'Agata R., Calogher A.E. 2000. Effects of cancer and anti-neoplastic treatment on the human testicular function. *Journal of Endocrinological Investigation* **23**(10), 690-696.

- Duty S.M., Singh N.P., Ryan L., Chen Z., Lewis C., Huang T., Hauser R. 2002. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Human Reproduction* **17**(5), 1274-1280.
- Erenpreiss J., Hlevicka S., Zalkalns J., Erenpreisa J. 2002. Effects of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormaln semen samples. *Journal of Andrology* **23**, 717-723.
- Evenson D.P., Jost L.K., Corzett M., Balhorn R. 2000. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *Journal of Andrology* **21**, 739-746.
- Evgeni E., Charalabopoulos K., Asimakouloulos B. 2014. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *Journal of Reproduction and Infertility* **15**(1), 2-14.
- Fischer M.A., Willis J., Zini A. 2003. Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology* **61**, 207-211.
- Fox S.I. 2004. *Human Physiology*, 8th Edition. McGraw-Hill Companies, Boston, MA.
- French D.B., Desai N.R., Agarwal A. 2008. Varicocele repair: does it still have a role in infertility treatment? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **20**(3), 269-274.
- Henkel R., Hajimohammad M., Stalf T., Hoogendijk C., Mehnert C., Menkveld R., Gips H., Schill W. B., Kruger T. F. 2004. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility* **81**, 965-972.
- Holstein A.F., Schulze W., Davidoff M. 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1**, 107.
- Huszar G., Jakab A., Sakkas D., Ozenci C.C., Cayli S., Delpiano E., Ozkavukcu S. 2007. Fertility testing and Icsi sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reproductive BioMedicine Online* **14**(5), 650-663.
- Kalthur G., Adiga S.K., Upadhya D., Rao S., Kumar P. 2008. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertility and Sterility*. **89**, 1723–1727.
- Karydis S., Asimakopoulos B., Papadopoulos N., Vakalopoulos I., Al-Hasani S., Nikolettos N. 2005. ICSI outcome is not associated with the incidence of spermatozoa with abnormal chromatin condensation. *In Vivo* **19**(5), 921-925.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**, 239-257.

- Kuhnert B., Nieschlag E. 2004. Reproductive function of the ageing male. *Human Reproduction Update* **10**, 327-339.
- de Lamirande E., Gagnon C. 1995. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction* **10**, 15-21.
- Leduc F., Nkoma G.B., Boissonneault G. 2008. Spermiogenesis and DNA repair: a possible etiology of human infertility and genetic disorders. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **54(1)**, 3-10.
- Li Z., Wang L., Cai J., Huang H. 2006. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **23**, 367-376.
- Lin M.H., Kuo-Kuang L.R., Li S.H., Lu C.H., Sun F.J., Hwu Y.M. 2008. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vivo fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related spontaneous abortion rates. *Fertility and Sterility* **90(2)**, 352-359.
- MacLeod J., Gold R. Z. 1956. The male factor in fertility and infertility .VIII. A study of variation in semen quality. *Fertility and Sterility*. **7**, 387.
- Mallidis C., Howard E. J., Baker H. W .G. 1991. Variation of semen quality in normal men. *International Journal of Andrology* **14**, 99-107.
- Marmar J.L. 2001. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Human Reproduction Update* **7**, 461-472.
- Martianov I., Brancorsini S., Catena R., Gansmuller A., Kotaja N., Parvinen M., Sassone-Corsi P., Davidson I. 2005. Polar nuclear localization of HIT2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**, 2808-2813.
- McPherson S., Longo F.J. 1993. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *European Journal of Histochemistry* **37**, 109-128.
- Meeker J.D., Singh N.P., Hauser R. 2008. Serum concentrations of estradiol and free T4 are inversely correlated with sperm DNA damage in men from an infertility clinic. *Journal of Andrology* **29**, 379–388.

- Mitra A., Chakraborty B., Mukhopadhyay D., Pal M., Mukherjee S., Banerjee S., Chaudhuri K. 2012. Effect of smoking on semen quality, FSH, testosterone level, and CAG repeat length in androgen receptor gene of infertile men in an Indian city. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **58**, 255-262.
- Morris I.D., Illott S., Dixon L., Brison D.R. 2002. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction* **17**, 990–998.
- Nallella K.P., Sharma R.K., Aziz N., Agarwal A. 2006. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and Sterility* **85(3)**, 629-634.
- Nasr-Esfahani M.H., Salehi M., Razavi S., Anjomshoa M., Rozbahani S., Moulavi F., Mardani M. 2005. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* **11**, 198–205.
- Oldereid N.B., Rui H., Purvis K. 1992. Life styles of men in barren couples and their relationship to sperm quality. *International Journal of Fertility* **37**, 343-349.
- Ollero M., Gil-Guzman E., Lopez M.C., Sharma R.K., Agarwal A., Larson K., Evenson D., Thomas A.J. Jr., Alvarez J.G. 2001. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reproduction* **16**, 1912-1921.
- Pacey A.A., Povey A.C., Clyma J.A., McNamee R., Moore H.D., Baillie H., Cherry N.M. 2014. Modifiable and non-modifiable risk factors for poor sperm morphology. *Human Reproduction* **29(8)**, 1629-1636.
- Pound N., Javed M.H., Ruberto C., Shaikh M.A., Del Valle A.P. 2002. Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates. *Physiology and Behavior* **76**, 685-689.
- Povey A.C., Clyma J.A., McNamee R., Moore H.D., Baillie H., Pacey A.A., Cherry N.M. 2012. Modifiable and non-modifiable risk factors for poor semen quality: a case-referent study. *Human Reproduction* **27(9)**, 2799-2806.
- Sakkas D., Alvarez J.G. 2010. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility* **93(4)**, 1027-1036.
- Saleh R.A., Agarwal A., Kandirali E., Sharma R.K., Thomas A.J., Nada E.A., Evenson D.P., Alvarez J.G. 2002. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertility and Sterility* **78(6)**, 1215-1224.

- Saleh R.A., Agarwal A., Nelson D.R., Nada E.A., El-Tonsy M.H., Alvarez J.G., Thomas A.J. Jr., Sharma R.K. 2002. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility* **78**(2), 313-318.
- Saleh R.A., Agarwal A., Sharma R.K., Said T.M., Sikka S.C., Thomas A.J. Jr. 2003. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertility and Sterility* **80**, 1431-1436.
- Sergerie M., Mieuisset R. Croute F., Daudin M., Bujan L. 2007. High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness. *Fertility and Sterility* **88**(4), 970e1-7
- Shamsi M.B., Venkatesh S., Tanwar M., Talwar P., Sharma R.K., Dhawan A., Kumar R., Gupta N.P., Malhotra N., Singh N., Mittal S., Dada R. 2009. DNA integrity and semen quality in men with low seminal antioxidant level. *Mutation Research* **665**, 29-36.
- Sivananthan T., Bathur F., Jimenez M., Conway A., Idan A., Handelsman D. 2012. Objective non- intrusive markers of sperm production and sexual activity. *Asian Journal of Andrology* **14**, 476-480.
- Spano M., Seli E., Bizzaro D., Manicardi G.C., Sakas D. 2005. The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **17**(3), 255-260.
- Sun F., Ko E., Martin R.H. 2006. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology. *Reproductive Biology and Endocrinology* **4**, 1
- Vander A.J., Luciano D., Sherman J. 2001. *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*, 8th Edition. McGraw-Hill Higher Education, Boston, MA.
- Virro M.R., Larson-Cook K.L., Evenson D.P. 2004. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility* **81**, 1289–1295.
- Wegner C.C., Clifford A.L., Jilbert P.M., Henry M.A., Gentry W.L. 2010. Abnormally high body mass index and tobacco use are associated with poor sperm quality as revealed by reduced sperm binding to hyaluronan-coated slides. *Fertility and Sterility* **93**, 332-334.

- Wogatzky J., Wirleitner B., Stecher A., Vanderzwalmen P., Neyer A., Spitzer D., Schuff M., Schechinger B., Zech N.H. 2012. The combination matters - distinct impact of lifestyle factors on sperm quality: a study on semen analysis of 1683 patients according to MSOME criteria. *Reproductive Biology and Endocrinology* **10**, 115-123.
- World Health Organization 2010.: WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed.
- Wouters-Tyrou D., Martinage A., Chevaillier P., Sautiere P. 1998. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* **80**, 117-128.
- Wyrobek A.J., Eskenazi B., Young S., Arnheim N., Tiemann-Boege I., Jabs E.W., Glaser R.L., Pearson F.S., Evenson D. 2006. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103(25)**, 9601-9606.
- Xia Y., Cheng S., Bian Q., Xu L., Collins M.D., Chang H.C., Song L., Liu J., Wang S., Wang X. 2005. Genotoxic effects on spermatozoa of carbaryl-exposed workers. *Toxicological Sciences* **85(1)**, 615-623.
- Zini A., Sigman M. 2009. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *Journal of Andrology* **30(3)**, 219-229.

7. PRILOZI

7.1. Obavijest za ispitanika

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

ETIČKO POVJERENSTVO

Prilog T1: Obavijest za ispitanika

Poštovani/poštovana,

Pozivamo Vas da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju čiji je glavni cilj istražiti međusobnu povezanost DNA fragmentacije humanih spermija s građom, pokretljivošću i koncentracijom. To istraživanje se provodi u sklopu diplomskog rada. Voditelji projekta su izv. prof. dr. sc. Vesna Benković, Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilište u Zagrebu i dr. sc. Patrik Stanić, Odjel za metode pomognute oplodnje, Zavod za humanu reprodukciju, Klinike za ženske bolesti i porode, KBC Zagreb, a predviđeno trajanje projekta je od 15.6.2014. do 15.8.2014. Projekt se provodi u Poliklinici "Škvorc" i na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu, a financiran je od strane Poliklinike "Škvorc" i PMF-a.

Vaše sudjelovanje u istraživanju treba se temeljiti na jasnom razumijevanju ciljeva istraživanja i načina i postupaka za njegovo provođenje te mogućih koristi ili rizika za Vas kao ispitanika. Stoga Vas molimo da, prije donošenja odluke, pažljivo pročitate i proučite ovu obavijest, a ako u njoj nađete na bilo kakve nejasnoće ili nepoznate riječi i izraze da o tome pitate istraživače i liječnike koji u istraživanju sudjeluju i dužni su Vam i spremni odgovoriti na svako pitanje.

OPIS KLJUČNOG PROBLEMA I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

U ovom radu se istražuje plodnost u muškaraca, odnosno istražuje se kako su uobičajene metode analize ejakulata povezane s analizom DNA fragmentacije spermija, kao i povezati životne navike ispitanika s kvalitetom spermija.

Stoga je u ovom istraživanju temeljna znanstvena pretpostavka (hipoteza) istraživača da je smanjena pokretljivost, koncentracija i građa humanih spermija međusobno povezana s povećanom DNA fragmentacijom spermija.

CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Istraživati će se kvaliteta humanog ejakulata, a Vaše osobno sudjelovanje je bitno jer će i parametri analize Vašeg uzorka ejakulata pridonijeti pouzdanijim rezultatima ovog istraživanja. Osobno ćete saznati i nešto više o svojoj plodnosti.

ULOGA VAS KAO ISPITANIKA U ISTRAŽIVANJU

Vaša uloga je dati uzorak ejakulata (vrijeme apstinencije 2-7 dana) i odgovoriti na nekoliko pitanja kako bismo saznali za istraživanje bitne specifičnosti vašeg načina života. Odnosno, student koji radi diplomski rad ispitat će Vas o načinu života, dati Vam čašicu za uzorak ejakulata te se dogovoriti kad ćete uzorak donijeti na analizu. Vašim podacima i uzorku će biti dodijeljen nasumični broj kako bi se zaštitio Vaš identitet, a povezanost tog broja i Vas će znati samo voditelji diplomskog rada te ovisno o Vašim željama obavijestiti Vas o rezultatima i tijeku istraživanja. Na uzorku ejakulata će se odrediti građa, pokretljivost i koncentracija spermija u Poliklinici Škvorc, a DNA fragmentacija spermija na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a.

KOJE SU ZA VAS MOGUĆE PREDNOSTI I KORISTI OD SUDJELOVANJA?

Rezultati analiza će Vam biti pokazatelj stanja Vaše plodnosti. U slučaju smanjene plodnosti možete zatražiti pomoć stručnjaka i povećati vjerojatnost uspješne oplodnje, kao i izbjeći moguće dodatno iznenađenje i stres pri pokušavanju začeca. Analize će se obaviti o našem trošku, čime nemate financijskog opterećenja.

KOJI SU ZA VAS MOGUĆI RIZICI SUDJELOVANJA U ISTRAŽIVANJU?

Ovo istraživanje ne donosi nikakav rizik za Vaše zdravstveno stanje. Jedino može izazvati stres ako rezultati analize ne budu kakve biste očekivali.

POSTOJE LI DRUGI LIJEKOVI, DRUGE DIJAGNOSTIČKE METODE ILI DRUGI OPERATIVNI PRISTUPI?

Građa, koncentracija i pokretljivost spermija će se obavljati prema WHO smjernicama o analizi humanih spermija, a DNA fragmentacija pomoću komet testa koji je pouzdan i učinkovit.

MORATE LI SUDJELOVATI U ISTRAŽIVANJU?

Vi ćete u potpunosti slobodno i samostalno odlučiti hoćete li u ovom istraživanju sudjelovati ili ne. Vaše sudjelovanje je dragovoljno i u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga, imate se pravo bez ikakvih posljedica povući iz istraživanja. Ako odlučite prekinuti svoje sudjelovanje u istraživanju, lijepo Vas molimo da o tome na vrijeme obavijestite voditelja projekta i njegove suradnike.

POVJERLJIVOST I PRAVO UVIDA U DOKUMENTACIJU

Svi Vaši osobni podaci biti će pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, a voditelj projekta i njegovi suradnici su dužni u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. U bazu podataka Vi ćete biti uneseni prema inicijalima imena i prezimena i pomoću nasumičnog broja (koda). Vašu medicinsku dokumentaciju će pregledavati samo voditelji ovog istraživanja u svrhu diplomskog rada, a Vaše ime nikada neće biti otkriveno trećim osobama. Pristup Vašoj dokumentaciji mogu imati i predstavnici Etičkog povjerenstva u ustanovi u kojoj se liječite (lokalno etičko povjerenstvo) te predstavnici Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta, koje je odgovorno za odobravanje i nadzor nad provođenjem ovog istraživanja.

ZA ŠTO ĆE SE KORISTITI PODACI DOBIVENI U OVOM ZNANSTVENOM ISTRAŽIVANJU?

Podaci dobiveni u ovom znanstvenom istraživanju koristiti će se u svrhu izrade diplomskog rada, ali i u svrhu daljnjeg razvoja i unapređenja znanosti. Stoga se očekuje da se ti podaci objave u odgovarajućim znanstvenim časopisima i publikacijama. Pri tome će Vaš identitet ostati u potpunosti anoniman i zaštićen.

TKO ORGANIZIRA I FINANCIRA OVO ISTRAŽIVANJE?

Ovo istraživanje financira Poliklinika "Škvorc" i Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE?

Ovo istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, nakon temeljite analize dostavljenog prijedloga istraživanja i prateće dokumentacije. Istraživanje se provodi u skladu sa svim primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući «Osnove dobre kliničke prakse» i «Helsinšku deklaraciju».

KOGA MOŽETE KONTAKTIRATI ZA DODATNE OBAVIJESTI I UPITE?

Ako su Vam potrebne bilo kakve dodatne informacije, ili imate dodatnih pitanja, slobodno se obratite voditelju projekta ili njegovim suradnicima, kako slijedi:

izv. prof. dr. sc. Vesna Benković
Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
Zavod za animalnu biologiju
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb
Tel: 385 (01) 4877-708

Dr. sc. Patrik Stanić, dipl. inž. biol.
Zavod za humanu reprodukciju
Klinike za ženske bolesti i porode
Kliničkog bolničkog centra Zagreb
Petrova 13, 10 000 Zagreb
Tel: 385 (01) 4604-765
Fax: 385 (01) 2376 267

Ante Ševo

Biološki odsjek

Prirodoslovno-matematički fakultet

Sveučilište u Zagrebu

Tel: 385 (098) 9033-645

TKO ĆE JOŠ BITI OBAVIJEŠTEN O OVOM ISTRAŽIVANJU?

O Vašem sudjelovanju u ovom znanstvenom istraživanju biti će obaviješten i Vaš obiteljski liječnik (ako je riječ o ispitaniku koji je psihijatrijski pacijent, obavijest o sudjelovanju mora dobiti i odrasli član obitelji).

O VAŠOJ PISANOJ SUGLASNOSTI ZA SUDJELOVANJE U OVOM ISTRAŽIVANJU

Preslik dokumenta (potpisne stranice) koji trebate potpisati ako pristajete sudjelovati u ovom istraživanju dobit ćete Vi i voditelj istraživanja. Izvorni primjerak dokumenta će zadržati i čuvati voditelj istraživanja.

Hvala Vam što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili mogućnost Vašeg sudjelovanja u ovom znanstvenom istraživanju.

Oba obavijest je sastavljena u skladu s odredbama Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakona o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

Napomena: Prilikom predaje dokumentacije za Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta, ovu Obavijest za ispitanika i Potpisnu stranicu njegove Suglasnosti za sudjelovanje u istraživanju MORA potpisati voditelj istraživanja.

7.2. Suglasnost za ispitanika

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

ETIČKO POVJERENSTVO

Prilog T2:

Suglasnost za sudjelovanje odraslog ispitanika u istraživanju humanog ejakulata

1. Potvrđujem da sam dana _____ u _____ pročitao/pročitala Obavijest za ispitanika za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja.
2. Razumijem da je moje sudjelovanje dragovoljno i da se iz sudjelovanja u istraživanju mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica za moje zdravstveno stanje ili pravni status.
3. Razumijem da mojoj medicinskoj dokumentaciji pristup imaju samo odgovorne osobe, to jest voditelj istraživanja i njegovi suradnici te članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja i Etičkog povjerenstva koje je odobrilo ovo znanstveno istraživanje. Tim osobama dajem dopuštenje za pristup mojoj medicinskoj dokumentaciji.
4. Pristajem da moj obiteljski liječnik (odnosno član obitelji) bude upoznat s mojim sudjelovanjem u navedenom znanstvenom istraživanju.
5. Želim i pristajem sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanika:

Vlastoručni potpis:

Mjesto i datum:

Ime i prezime osobe koja je vodila postupak Obavijesti za ispitanika i Suglasnosti za sudjelovanje:

Ime i prezime voditelja projekta:

Vlastoručni potpis:

Mjesto i datum:

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci: Ante Ševo, 19.7.1985

Žumberačka 15, 10430 Samobor (Croatia)

+385989033645

sevoan@me.com

Obrazovanje: 03.10.2012. - 24.09.2014. Magistar Molekularne Biologije

PMF (Biologija), Zagreb (Croatia)

14.07.2008. - 14.09.2012. Prvostupnik Molekularne Biologije

PMF (Biologija), Zagreb (Croatia)

19.07.2005. - 11.10.2007. Doktor Medicine

Medicinski Fakultet, Zagreb (Croatia)

13.07.2004. - 18.07.2005. Profesor Matematike i Fizike

PMF (Matematika), Zagreb (Croatia)

04.07.2000. - 18.05.2004.

Gimnazija A. G. Matoša, Samobor (Croatia)

Osobne vještine:

- hrvatski (materinski), engleski (C1), njemački (A2), talijanski (A1)
- timski rad, komunikativnost, kreativnost, upornost, organizacijske sposobnosti
- Windows i MacOS
- tenis, standardni i latinsko-američki plesovi, crossfit, kyokushin karate, shotokan karate, odbojka, teretana, plivanje, glazbena škola (saksofon)
- vozačka dozvola B kategorije

Ostalo:

- demos kolegija Animalne fiziologije i Laboratorijskih životinja u biološkim istraživanjima
- "Noć biologije", "Case study competition", "App start contest"